

Polymorphismen in den MDR1-, MRP1- und cKIT-Genen des Hundes und ihre Bedeutung für eine individualisierte und zielgerichtete Krebstherapie

IRINA GRAMER



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Polymorphismen in den MDR1-, MRP1- und cKIT-Genen des Hundes und ihre Bedeutung für eine individualisierte und zielgerichtete Krebstherapie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Irina Gramer

Tierärztin aus Bonn

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer
Prof. Dr. E. Burkhardt
PD Dr. Christoph Rummel

Tag der Disputation: 27.06.2013

Für meine Familie,
die mich bei allen Entscheidungen stets unterstützt hat!

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
1 EINLEITUNG	1
2 STAND DER FORSCHUNG UND LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 DAS MALIGNEN LYMPHOM DES HUNDES	3
2.1.1 Vorkommen und Inzidenz	3
2.1.2 Stadieneinteilung	3
Anatomische Stadien	4
Klinische Stadien	4
2.1.3 Histomorphologische Klassifikation und Immunphänotypisierung	5
2.2 CHEMOTHERAPIE DES MALIGNEN LYMPHOMS	6
2.3 DIE BEDEUTUNG VON MDR1 UND MRP1	7
2.3.1 Charakterisierung von ATP-getriebenen Effluxtransportern	7
MDR1	7
MRP1	8
2.3.2 Polymorphismen im MDR1-Gen	8
Bedeutung von Polymorphismen in der Humanmedizin	8
MDR1-Gendefekt beim Hund	9
2.3.3 Polymorphismen im MRP1-Gen	12
2.4 THERAPIEVERSAGEN DURCH MEDIKAMENTENRESISTENZ	12
2.4.1 Verschiedene Mechanismen der Therapieresistenz	12
2.4.2 Therapieresistenz durch MDR1	14
2.5 KOMPLIKATIONEN DER CHEMOTHERAPIE	15
2.5.1 Myelosuppression	17
2.5.2 Gastrointestinale Toxizität	17
2.6 TYROSINKINASEINHIBITOREN	18
2.6.1 Charakterisierung des cKIT-Gens	18
2.6.2 Mutationen im cKIT-Gen	20
2.6.3 Tyrosinkinaseinhibitoren als neue Therapieoption in der Veterinärnarkologie	21
3 MATERIAL	23
3.1 MATERIALIEN FÜR DIE SEQUENZANALYSE	23
3.1.1 Primer für die Sequenzierung	23
MDR1	23
MRP1	24
cKIT	24
3.1.2 Polymerasen und kommerziell erhältliche Kits, sonstige Materialien	25
3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	26
3.2.1 Native-Agarose-Gelelektrophorese für DNA	26
3.3 MATERIALIEN FÜR DIE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	26
3.3.1 TaqMan Gene Expression Assays für die quantitative Real Time PCR	26
3.3.2 TaqMan Gene Expression Master Mix	27
3.3.3 Sonstiges Material	27
3.4 MATERIALIEN UND EDV-PROGRAMME ZUR STATISTISCHEN AUSWERTUNG	27
3.4.1 Material	27
3.4.2 EDV-Programme	29
3.4.3 Bioinformatische Datenbanken	29
3.5 CHEMISCHE SUBSTANZEN	30
3.6 GERÄTE	31

3.7	VERBRAUCHSMATERIAL.....	32
4	METHODEN	34
4.1	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
4.1.1	RNA-Konzentrationsbestimmung	34
4.1.2	DNase I.....	34
4.1.3	Native Agarose-Gelelektrophorese.....	35
4.1.4	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	35
4.1.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
4.2	PROBENACQUISITION, PROBENGEWINNUNG UND TUMORIDENTIFIZIERUNG	36
4.2.1	Acquisition von Blut- und Gewebeproben	36
4.2.2	Bestimmung von Lymphoblasten im Blutausstrich	37
4.2.3	Feinnadelaspiration und Tumoridentifizierung	39
4.2.4	Entnahme einer TruCut- oder Stanzbiopsie.....	41
4.3	METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND AUFARBEITUNG VON RNA	42
4.3.1	Total-RNA Isolierung aus Blut	42
4.3.2	Total-RNA Isolierung aus Gewebe	43
4.3.3	cDNA Synthese aus Total-RNA	44
4.4	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	44
4.4.1	Allgemeines zur Primerauswahl	44
4.4.2	PCR-Reaktionsansatz	45
4.4.3	Touchdown-PCR	46
4.4.4	Quantitative Real-Time PCR	47
4.5	SEQUENZIERUNG UND AUSWERTUNG DER SEQUENZSPUREN	48
4.6	BEWERTUNG VON AMINOSÄURESUBSTITUTIONEN MIT DEN PROGRAMMEN POLYPHEN UND SIFT	48
4.6.1	Bewertung nach PolyPhen.....	48
4.6.2	Bewertung nach SIFT	49
5	ERGEBNISSE.....	51
5.1	ALLGEMEINE PATIENTENCHARAKTERISTIKA.....	51
5.1.1	Identifizierung von Polymorphismen in den MDR1- und MRP1-Genen sowie Evaluierung einer MDR1-vermittelten Therapieresistenz	51
5.1.2	Identifizierung von Polymorphismen und „Gain-of-function“ Mutationen im cKIT Gen.....	55
5.2	SEQUENZANALYSE MDR1	56
5.2.1	MDR1 Primer und ihre Lokalisation	56
5.2.2	Polymorphismen im caninen MDR1-Gen	57
5.3	MDR1-EXPRESSIONSNIVEAU BEI HUNDEN MIT NEBENWIRKUNGEN	62
5.4	THERAPIERESISTENZ DURCH MDR1 BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN	65
5.4.1	Sensitivität der verwendeten Assays	65
5.4.2	Entwicklung einer Therapieresistenz bei 15 Patienten (Teilstudie III).....	66
5.5	SEQUENZANALYSE MRP1	70
5.5.1	MRP1 Primer und Lokalisation	70
5.5.2	Polymorphismen im caninen MRP1-Gen.....	71
5.6	EVALUIERUNG VON NEBENWIRKUNGEN BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN	75
5.7	SEQUENZANALYSE CKIT	82
5.7.1	cKIT Primer und Lokalisation	82
5.7.2	Polymorphismen und Mutationen im cKIT-Gen	83
6	DISKUSSION.....	90
6.1	CHEMOTHERAPIE UND IHRE NEBENWIRKUNGEN	90
6.2	INDIVIDUALISIERTE THERAPIE?	96

6.2.1	Genetische Varianten nehmen Einfluss auf die Therapie	97
6.2.2	MDR1-Expressionsniveau als Ursache für die Therapieunverträglichkeit	100
6.2.3	Chemotherapie: Resistenz und Wirkungsverlust!	104
6.3	ZIELGERICHTETE KREBSTHERAPIE.....	106
7	ZUSAMMENFASSUNG	110
8	SUMMARY.....	112
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
10	ANHANG	130
11	DANKSAGUNGEN.....	135
12	ERKLÄRUNG.....	137

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Rasseverteilung der nt230(del4) MDR1 Mutation	10
Tabelle 2: Primer für die full-length Amplifikation des caninen MDR1-Transkriptes	23
Tabelle 3: Primer für die full-length Amplifikation des caninen MRP1-Transkriptes	24
Tabelle 4: Primer für die full-length Amplifikation des caninen cKIT- Transkriptes	24
Tabelle 5: Materialien für die Sequenzanalyse	25
Tabelle 6: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese	26
Tabelle 7: TaqMan Gene Expression Assays	26
Tabelle 8: Gradeinteilungen nach Toxizität	28
Tabelle 9: Initiales Chemotherapieprotokoll der Tierklinik Hofheim.....	37
Tabelle 10: Zellen des caninen Blutes	38
Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz	45
Tabelle 12: Bewertung von Aminosäuresubstitutionen nach PolyPhen.....	49
Tabelle 13: Bewertung von Aminosäuresubstitutionen nach SIFT	50
Tabelle 14: Allgemeine Patientencharakteristika und Studienzuordnung (MDR1 und MRP1 Studie) 52	
Tabelle 15: Übersicht über den klinischen Status der untersuchten Patienten	54
Tabelle 16: Allgemeine Patientencharakteristika (cKIT-Studie).....	55
Tabelle 17: Polymorphismen-Bewertung bekannter caniner MDR1-Polymorphismen	58
Tabelle 18: MDR1-Polymorphismen bei den 18 Patienten aus Teilstudie II.....	60
Tabelle 19: Erstellung von Eichgeraden für die verwendeten Quantifizierungsassays zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz	66
Tabelle 20: MRP1-Polymorphismen von 18 Patienten	73
Tabelle 21: Rasseverteilung der 150 Lymphompatienten zur Evaluierung der Nebenwirkungen unter Chemotherapie	76
Tabelle 22: Rezidiv-Protokoll der Tierklinik Hofheim zur Lymphomtherapie beim Hund	77
Tabelle 23: Applikation von Zytostatika und resultierende Nebenwirkungen	78
Tabelle 24: Krankheitsrelevante Mutationen im cKIT-Gen bei Mensch und Hund	84
Tabelle 25: Sequenzvariationen im cKIT-Transkript, welche im Rahmen dieser Arbeit bei caninen Tumorph Patienten identifiziert wurden	87

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Mechanismen der Therapieresistenz	13
Abbildung 2:	Zellzyklus und Zytostatika.....	16
Abbildung 3:	Organisation der cKIT Rezeptortyrosinkinase	20
Abbildung 4:	Blutausstrich.....	39
Abbildung 5:	Zytologie eines malignen Lymphoms	40
Abbildung 6:	Zytologie eines Osteosarkoms.....	40
Abbildung 7:	Zytologie des malignen Melanoms.....	41
Abbildung 8:	Zytologie des Hämangiosarkoms.....	41
Abbildung 9:	Prinzip der quantitativen <i>Real-Time PCR</i> mittels TaqMan System.....	46
Abbildung 10:	Lokalisation der verwendeten Primer im Membrantopologiemodell des MDR1-Proteins	57
Abbildung 11:	Visualisierung der vier MDR1-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten MDR1-Transkripts.....	57
Abbildung 12:	Lokalisationen der identifizierten nicht-synonymen Polymorphismen im MDR1-Transporter	61
Abbildung 13:	Chromatogramm eines Hundes mit einer "AAT" Insertion.....	62
Abbildung 14:	Basales MDR1-Expressionsniveau vor Beginn der zytostatischen Therapie	63
Abbildung 15:	Real-time PCR Amplifikation von MDR1 und den Kontrollgenen HPRT1 und SDHA.	67
Abbildung 16:	Verlauf der MDR1-Expression in Blutzellen unter Chemotherapie bei 15 Patienten.	68
Abbildung 17:	Relativer Anstieg der MDR1-Expression.....	69
Abbildung 18:	Korrelation der Anstiegsfaktoren mit dem Tumorstatus	70
Abbildung 19:	Lokalisation der verwendeten Primer im Membrantopologiemodell des MRP1-Proteins	71
Abbildung 20:	Visualisierung der vier MRP1-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten MRP1-Transkripts	71
Abbildung 21:	Membrantopologie des MRP1-Transporters und Lokalisation aller Aminosäuresubstitutionen	74
Abbildung 22:	Repräsentatives Chromatogramm des heterozygoten Polymorphismus A1582C, welcher den Aminosäureaustausch K525T im MRP1-Protein verursacht.	75
Abbildung 23:	Knochenmarksuppression und GI-Symptome nach Zytostatika-Applikation bei Lymphompatienten	79
Abbildung 24:	Schweregrade entstandener Nebenwirkungen nach verschiedenen Zytostatika im Rahmen der Lymphomtherapie	81
Abbildung 25:	Visualisierung der drei cKIT-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten cKIT-Transkripts	83
Abbildung 26a/b:	Topologiemodell der cKIT-Rezeptortyrosinkinase	88
Abbildung 27:	cKIT-Insertion "GNSK" bei Hund1 Probe 1b mit der Diagnose malignes Lymphom .	89

ABKÜRZUNGEN

ABC	ATP Binding Cassette
ABCB1	ATP bindin cassette carrier family, member B1, syn.
MDR1	
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
β	beta
bp	base pair, Basenpaare
C219	monoklonaler Antikörper gegen das P-glycoprotein der Maus
cDNA	complementary DNA
cKIT	zelluläre Rezeptor-Tyrosinkinase vom Typ III
cm	Zentimeter
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CYP	Cytochrom P-450
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
E	Extinktionskoeffizient
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Forward-Primer, Vorwärts-Primer
G	Gauge (Außendurchmesser einer Kanüle)
g	Gramm
GI	gastrointestinal
GST	Glutathionyl-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
kb	Kilo-Basenpaare
KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
LLN	lower limit of normal
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MDR	Multidrug-resistance
ME	Mercaptoethanol
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
MRP	Multidrug-related Protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid Assay
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p53	tumor protein 53, Tumorprotein 53
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Ketten- reaktion
pg	Pikogramm
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping
PSIC	Position-Specific Independent Counts
R	Rückwärts-Primer
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SCF	Stammzellofaktor
SDHA	Succinat-Dehydrogenase
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLC	Solute Carrier
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STI-571	Imatinib
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TKIs	Tyrosinkinaseinhibitoren
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCOG	Victorian Cooperative Oncology Group
W	Watt
WHO	World's Health Organization
XME	tumor expressed Xenobiotic metabolizing enzymes

Einbuchstabencode der Aminosäuren:

Aminosäure	Einbuchstabencode
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

In der heutigen Zeit wird die Diagnose Krebs im Bereich der Kleintiermedizin immer häufiger aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung der Patienten gestellt. Dies liegt vor allem an den veränderten Lebensbedingungen der Haustiere, die sich durch eine bessere Ernährung, regelmäßige Impfungen sowie verbesserte Behandlungsmaßnahmen auszeichnen. Weiterhin ist die Bereitschaft der Besitzer gestiegen, eine Krebstherapie durchzuführen. Im Gegensatz zur Humanmedizin, in der eine Heilung des Patienten angestrebt wird, steht in der Veterinärmedizin die Lebensverlängerung unter Erhalt der Lebensqualität im Vordergrund. Hinsichtlich dieser Entwicklungen in der Veterinärmedizin gewinnt die klinische Onkologie zunehmend mehr an Bedeutung. Ähnlich wie bei humanmedizinischen Studien, die immer stärker auf die Erforschung von Polymorphismen und auf Target orientierte Therapeutika für die Krebstherapie fokussiert sind, beschäftigen sich auch veterinärmedizinische Untersuchungen zunehmend mit diesen Themen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem interdisziplinären Thema aus den Bereichen pharmakologisch orientierter Molekulargenetik und klinischer Onkologie. Durch das Erfassen klinischer Befunde und die Auswertung molekulargenetischer Daten sollen sowohl die Therapieverträglichkeit (1) ermittelt, als auch die Entwicklung einer Therapieresistenz (2) verfolgt werden. Dabei steht der Hund als Lymphompatient im Mittelpunkt.

- (1) Ziel der Dissertation ist es, klinisch erfassbare Unverträglichkeitsreaktionen in Form einer Myelosuppression und/oder gastrointestinaler Symptome auf molekulargenetischer Ebene mit Polymorphismen in den Efflux-Transportergenen MDR1 und MRP1 oder einem aberranten MDR1-Expressionsniveau zu korrelieren. Diese beiden Effluxsysteme werden untersucht, da sie bekanntermaßen in der Lymphomtherapie eingesetzte Medikamente transportieren und somit für die Therapie von Bedeutung sind.
- (2) Weiterhin kann mit Hilfe regelmäßiger Blutentnahmen über alle Therapiezyklen die Entwicklung einer Therapieresistenz durch MDR1-Efflux verfolgt werden. Die Therapieresistenz stellt bis heute die häufigste Ursache für einen Therapiemisserfolg dar. Hierbei ist unter anderem der Arzneistoff-Efflux durch den MDR1-Transporter von Bedeutung, welcher von Tumorzellen gezielt hochreguliert wird. Diese Dissertation

ermittelt anhand der Klinik von Lymphompatienten und der relativen Expression von MDR1 einen Cut-Off-Wert für die Entwicklung der Therapieresistenz.

- (3) Ein weiterer Fokus liegt auf dem Einsatz innovativer Therapiemöglichkeiten in Form von Tyrosinkinaseinhibitoren beim Kleintier, die bislang eine Zulassung für Mastzelltumore beim Hund haben (Masitinib, Toceranib). Durch den Nachweis verschiedener Mutationen im cKIT-Gen soll eine Indikation dieser Präparate auch für andere Tumore evaluiert werden.

2 Stand der Forschung und Literaturübersicht

2.1 DAS MALIGNEN LYMPHOM DES HUNDES

2.1.1 Vorkommen und Inzidenz

Das maligne Lymphom des Hundes zählt ebenso wie der Plasmazelltumor, myeloproliferative Erkrankungen, die lymphatische Leukämie und die maligne Histiozytose zu den Tumoren des hämatopoetischen Systems. Diese Tumoren stellen mit 83 % die häufigste dieser Tumorerkrankungen bei Hund und Katze dar (Jagielski et al., 2002). Das maligne Lymphom geht von juvenilen oder reifzelligen Lymphozyten im Blut aus. Diese Krebserkrankung ist vergleichbar mit dem Non-Hodgkin-Lymphom des Menschen und wurde beim Hund erstmals 1871 beschrieben (Baeckgren et al., 1965). Die Inzidenz liegt bei ca. 24 Fällen pro 100.000 Hunden pro Jahr (Baeckgren et al., 1965; Dorn et al., 1967).

Es können Hunde jeder Altersstufe betroffen sein, jedoch sind mittelalte Tiere zwischen sechs und acht Jahren deutlich überrepräsentiert. Aus der Literatur geht hervor, dass weder eine Geschlechts- noch eine Rassenprädisposition vorliegt (Parodi et al., 1968; Teske et al., 1994). Weiterhin kann für das maligne Lymphom des Hundes eine Assoziation mit viralen Infektionen nicht nachgewiesen werden; bei der Katze kann es hingegen mit dem feline Leukosevirus vergesellschaftet sein (Kaplan et al., 1974). Bei verschiedenen Hunderassen (z. B. Golden Retriever, Deutscher Schäferhund, Boxer, Scottish Terrier, Airedale Terrier und Englische Bulldogge) ist ein erhöhtes Erkrankungsrisiko beschrieben, wobei auch familiäre Häufungen auftreten (Baeckgren et al., 1965).

2.1.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des malignen Lymphoms des Hundes erfolgt mittels verschiedener Klassifizierungsschemata. Einerseits ist eine Einteilung anhand der anatomischen Lokalisation des Tumors möglich, andererseits durch das klinische Erscheinungsbild. Für beide Klassifizierungen gibt die WHO (World Health Organization) Einteilungen vor (Valli et al., 2002).

Anatomische Stadien

Beim malignen Lymphom des Hundes werden bei Diagnosestellung verschiedene Erscheinungsformen unterschieden, welche keinerlei Auswirkung auf die Therapie haben. Dies muss per Lymphknotenpalpation, sonographischer und röntgenologischer Untersuchung erfolgen. Bei einer anatomischen Unterteilung können sechs verschiedene Formen unterschieden werden: multizentrische, gastrointestinale oder alimentäre, mediastinale (Thymusleukose), kutane, echte leukämische und die extranodale Form (Kessler et al., 2005). Beim Hund stellt das multizentrische Lymphom die häufigste anatomische Lokalisation mit 84% dar (Baskin et al., 2000). Meist liegt eine generalisierte Lymphadenopathie vor, bei der auch Milz und Leber von Tumorzellen infiltriert sein können. Bei der alimentären Form, deren Häufigkeit zwei bis sieben Prozent beträgt, liegt entweder eine diffuse Infiltration der Darmwand vor oder ein solider Tumor in diesem Bereich. Die mediastinale Form zeichnet sich durch eine Vergrößerung der mediastinalen Lymphknoten und/oder des Thymus aus. Bei der kutanen Lymphomform sind generalisiert oder multifokal Hautrötungen, Plaques, Knötchen und/oder Ulzera erkennbar. Die echte leukämische Form äußert sich durch ein Auftreten von Tumorzellen (Lymphoblasten) im Blut, welche vom Knochenmark ausgeschwemmt wurden. Zur letzteren, der extranodalen Form, gehören unter anderem renale und okuläre Lymphome.

Klinische Stadien

Als klinisches Staging-System wird von der WHO die Stadieneinteilung des malignen Lymphoms bei domestizierten Tieren bezeichnet (Owen et al., 1980):

- I. Nur ein Lymphknoten oder lymphatisches Gewebe in einem Organ betroffen (Knochenmark ausgenommen)
- II. Viele Lymphknoten in einer Region betroffen (\pm Tonsillen)
- III. Lymphknoten generalisiert betroffen
- IV. Leber und/oder Milz betroffen (\pm Stadium III)
- V. Manifestation im Blut sowie Knochenmark und/oder andere Organsysteme betroffen (\pm Stadien I-IV)

Die klinische Stadieneinteilung ist ein wichtiger Faktor, um die mediane Überlebenszeit sowie die Ansprechrate auf eine Chemotherapie angeben zu können. Die meisten Hunde werden erst in fortgeschrittenen Lymphomstadien (III-V) vorgestellt (Squire et al., 1973).

Zusätzlich zu dieser Stadieneinteilung findet eine Subklassifizierung statt: **a**, Patienten ohne klinische Symptome und **b**, klinisch kranke Tiere. Hunde mit der Subklassifizierung **a** haben eine bessere Prognose als Patienten der Subklasse **b**.

2.1.3 Histomorphologische Klassifikation und Immunphänotypisierung

Sowohl die histomorphologische Klassifizierung als auch eine Immunphänotypisierung stellen wichtige prognostische Faktoren für die mediane Überlebenszeit dar (Kiupel et al., 1999). Während die Immunphänotypisierung keinen therapeutischen Einfluss nimmt, kann mit Hilfe der morphologischen Klassifizierung zusätzlich zur prognostischen Aussage auch ein geeignetes Therapieprotokoll gewählt werden.

In der Humanmedizin werden vier morphologische Klassifizierungsschemata besonders hervorgehoben: Kiel, Lukes-Collins, Rappaport und die Working Formulation (Lennert et al., 1975; Lukes et al., 1978; Anon et al., 1982; Lieberman et al., 1986; Greenlee et al., 1990). Für die Veterinärmedizin wurde ein Klassifizierungsschema entwickelt, das sich an das derzeit gültige Schema beim Menschen anlehnt (Valli et al., 2002). Zumeist werden die Klassifikationen nach *Kiel* oder die *Working Formulation* angewendet. Die Kiel-Klassifikation wird meist als prognostischer Faktor für die erste Remissionszeit, welche die Zeit bis zur ersten Tumorprogression beschreibt, verwendet. Die Working Formulation hingegen wird zur Angabe der medianen Überlebenszeit herangezogen (Kiupel et al., 1999).

Bei einer Immunphänotypisierung können im Wesentlichen zwei Typen, das B-Zell- und T-Zell-Lymphom, unterschieden werden. B-Zell-Lymphome treten vor allem bei der multizentrischen und gastrointestinalen Form sowie dem kleinzelligen Lymphom auf. Die mediastinale und kutane Form sind meist durch den T-Zell-Typ gekennzeichnet.

Diese beiden Immunphänotypen (B-Zell- und T-Zell-Lymphom) werden in der Lymphomdiagnostik als prognostische Faktoren verwendet. So kann sowohl anhand des Phänotyps als auch anhand der Reifzelligkeit (reifzellige oder juvenile Lymphozyten) eine Aussage über mediane Überlebenszeit und Remissionszeit getroffen werden (Teske et al., 1994).

2.2 CHEMOTHERAPIE DES MALIGNEN LYMPHOMS

Das maligne Lymphom ist eine der am besten zu behandelnden malignen Tumorerkrankungen beim Hund (Ettinger et al., 2003). Hinsichtlich der Therapie des malignen Lymphoms gibt es sehr verschiedene Protokolle, welche regional unterschiedlich sind und sich jeweils auf Studienergebnisse in der Literatur und verschiedene Erfahrungswerte stützen. Angestrebt ist immer ein schneller und vollständiger Rückgang des Tumors, welcher bei den einzelnen Therapieprotokollen jedoch unterschiedlich rasch oder lang andauernd (= tumorfreies Intervall; Remissionszeit) erreicht wird. Dies wird in der Onkologie als komplette Remission bezeichnet, welche an zwei Kontrollterminen in einem Mindestabstand von vier Wochen zu beobachten ist (Miller et al., 1981). Interessant für den Patientenbesitzer ist aber nicht nur die Remissionszeit, sondern auch die mediane Überlebenszeit des Patienten. Diese bezeichnet die Zeitspanne beginnend am Zeitpunkt der Diagnose/Therapie, bei der die Hälfte der Patienten nach einem Jahr noch am Leben ist. Im Zuge der Therapie kommt es nicht immer zu einer kompletten Remission, sondern auch eine partielle Remission (50%iger Tumorrückgang an zwei Kontrollterminen in einem Mindestabstand von vier Wochen) oder eine stabile Erkrankung (weder Remission noch Progression des Tumors) können erreicht werden. Bei einer Tumorprogression kommt es trotz zytostatischer Therapie nicht zu einer Remission, sondern zum weiteren Wachstum um mindestens 25 %. Das Verhalten des Tumors unter Therapie ist abhängig von den eingesetzten Zytostatika, deren Dosierungen und der individuellen Resistenzlage des Patienten. Die vier verschiedenen Kriterien hinsichtlich der Ansprechrates auf eine Chemotherapie (komplette/partielle Remission, stabile Erkrankung, Progression) werden sowohl von der WHO als auch von RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) definiert (Therasse et al., 2000; Anon et al., 2004).

Die durchschnittlichen Überlebenszeiten sind nicht nur abhängig vom jeweils verwendeten Protokoll, sondern auch vom Zeitpunkt der Diagnose. Grundsätzlich ist bei den Therapieprotokollen die Monotherapie von Kombinationsprotokollen zu unterscheiden. Eine Monotherapie wird meist mit Doxorubicin im dreiwöchigen Abstand durchgeführt (Valerius et al., 1997). Ebenso gehört die Applikation von Glukokortikoiden zu den Monotherapien; allerdings liegen die durchschnittlichen Überlebenszeiten lediglich bei ein bis zwei Monaten (Bell et al., 1984). Bei den Kombinationsprotokollen sind in der Literatur vor allem vier am besten charakterisiert: COP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon), COAP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Cytosin Arabinosid), Madison-Wisconsin (L-Asparaginase, Vincristin,

Doxorubicin, Cyclophosphamid, Mitoxantron) und CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) (Hosoya et al., 2007; Keller et al., 1993; MacEwen et al., 1981; Greenlee et al., 1990). Die bisher genannten Protokolle werden in erster Linie zur Initialtherapie eingesetzt.

Kommt es zu einer erneuten Tumorprogression, so ist die Länge des tumorfreien Intervalls entscheidend dafür, ob das Initialprotokoll wiederholt werden kann oder ein sogenanntes Rescue-Protokoll wie das MOPP-Protokoll (Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednisolon) oder die Präparate Lomustin und Dacarbazin eingesetzt werden müssen (Rassnick et al., 2002; Flory et al., 2008). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Therapieprotokoll entspricht einem modifizierten CHOP-Protokoll und ist in Tabelle 9 (Seite 37) näher beschrieben.

2.3 DIE BEDEUTUNG VON MDR1 UND MRP1

2.3.1 Charakterisierung von ATP-getriebenen Effluxtransportern

MDR1

Bei MDR1 handelt es sich um einen als P-glycoprotein bezeichneten Effluxtransporter aus der Familie der ATP-Binding-Cassette (ABC) Transporter. MDR1 wird in der Literatur synonym mit der systematischen Nomenklatur ABCB1 verwendet. MDR1 wird im Gastrointestinaltrakt, den proximalen Tubuli der Nieren, Leberhepatozyten und in den Gefäßendothelien der Blut-Hirn-Schranke exprimiert (Thiebaut et al., 1987). Aufgrund dieser Lokalisationen hat MDR1 einen wesentlichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, welche von MDR1 transportiert werden: Im Darm limitiert MDR1 die enterale Absorption und in Leber und Niere begünstigt MDR1 die Elimination in Galle und Urin. Darüber hinaus vermindert MDR1 das Eindringen von lipophilen Stoffen in das ZNS (Schinkel et al., 1999; Fromm et al., 2004). Erstmals wurde P-Glycoprotein von Juliano und Ling in Ovarietumorzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) beschrieben, in denen eine Resistenz gegenüber Colchizin und verschiedenen Zytostatika beobachtet wurde (Juliano und Ling, 1976). Heute wissen wir, dass MDR1 eine ganze Reihe verschiedener Zytostatika transportieren kann, wie Doxorubicin, Vinblastin, Actinomycin D, Daunomycin, Paclitaxel, Teniposid, Etoposid, Docetaxel, u. a.

(Gottesman et al., 2002; Luqmani et al., 2005). Diese Tatsache ist wichtig für das Verständnis der nachfolgenden Versuche und Daten, denn Tumorzellen nutzen den MDR1-Transporter zum Auswurf dieser Zytostatika und vermindern dadurch deren intrazelluläre Zytotoxizität (Ambudkar et al., 1999).

MRP1

Der als Multidrug-Related Protein bezeichnete Transporter MRP1 (ABCC1) gehört ebenso wie MDR1 zur Familie der ATP-abhängigen Effluxtransporter. Dieser wird vor allem in Lunge, Hoden, Niere, Muskulatur, peripheren Blutzellen und an der Blut-Liquor-Schranke exprimiert. Physiologischerweise transportiert MRP1 eine Reihe konjugierter und nicht-konjugierter organischer Anionen. Am besten ist hierbei Leukotrien C₄ charakterisiert, aber auch Glutathiondisulfid und reduziertes Glutathion gehören zu den Substraten von MRP1 (Conseil et al., 2005). MRP1 ist verantwortlich für die Resistenz gegenüber verschiedenen Arzneistoffen in Tumorzellen. So können die Zytostatika Doxorubicin, Epirubicin, Etoposid, Vincristin und Methotrexat auch über MRP1 transportiert werden (Gottesman et al., 2002).

2.3.2 Polymorphismen im MDR1-Gen

Bedeutung von Polymorphismen in der Humanmedizin

Die Wirkung von Medikamenten im Organismus ist im Wesentlichen abhängig von ihrer Absorption, Distribution, ihrem Metabolismus und ihrer Exkretion (Choudhuri und Klaassen, 2006). Diese verschiedenen Reaktionen im Körper werden durch unterschiedliche Enzym- und Transportsysteme, wie beispielsweise MDR1 und MRP1, gesteuert und beeinflusst. Aus diesem Grund ist die individuelle genetische Variabilität dieser Gene entscheidend für Medikamenteninteraktionen, den Erkrankungsverlauf, Resistenzentwicklungen und die Verträglichkeit verschiedener Arzneistoffe (Sauna et al., 2007). Es ist aus der Literatur bekannt, dass Polymorphismen in den beteiligten Enzymen und Transportern einen entscheidenden Einfluss auf den Therapieerfolg nehmen können.

Daher hat die Erforschung von genetischen Polymorphismen insbesondere in der Humanmedizin einen hohen Stellenwert. Der Großteil dieser Polymorphismen wird durch die sogenannten Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) gebildet. Basendeletionen, -insertionen

oder gar Genduplikationen sind dagegen eher selten. Bis heute konnten ca. 105 verschiedene SNPs im MDR1-Gen des Menschen identifiziert werden (Cascorbi, 2011; Kerb, 2006). Das Ziel dieser Forschungsrichtung liegt darin, über eine Korrelation von genetischen Polymorphismen und einer bestimmten Arzneistoffantwort, eine Prognose über die Arzneistoffwirkung und –verträglichkeit treffen zu können. SNPs im MDR1-Gen wurden sowohl *in vitro* mit Hilfe zellulärer Assays (Kim et al., 2001; Kroetz et al., 2003) als auch *in vivo* über die mRNA- oder Proteinexpression bestimmt und charakterisiert (Hoffmeyer et al., 2000; Lang et al., 2004). Unter den humanen Polymorphismen im MDR1-Gen wurden die Varianten 3435C>T in Exon 26, 2677G>T in Exon 21 und 1236C>T in Exon 12 umfangreich und eingehend erforscht. Fellay et al. (2002) konnten in einer Studie zeigen, dass HIV-Patienten mit der 3435TT Variante besser auf die antiretrovirale Therapie ansprachen als Menschen ohne die Variante (Fellay et al., 2002). Für einen anderen MDR1-Polymorphismus, 2005C>T, konnte in einer Studie von Liu et al. eine reduzierte Resistenz gegenüber Paclitaxel und Etoposid ermittelt werden (Liu et al., 2010). Viele dieser Studien über mögliche klinische Effekte dieser SNPs sind allerdings sehr divergent. So beschreiben mitunter einige Forscher, dass bestimmte genetische Varianten mit einer erhöhten P-Glycoprotein Expression und Funktion einhergehen, was in anderen Studien dann nicht bestätigt werden konnte (Kim et al., 2001; Drescher et al., 2002).

Nach wie vor bleibt die Auswirkung dieser SNPs im MDR1-Gen auf die Klinik damit weitestgehend unklar. Die Erforschung dieser Varianten ist vor allem für Arzneistoffe wie z. B. Zytostatika von großer Bedeutung, da diese eine sehr geringe therapeutische Breite haben. Mit einer genom-basierten individuellen Therapie könnte man dabei eine verbesserte Wirksamkeit und Verträglichkeit dieser Arzneistoffe erreichen (Sauna et al., 2007).

In der Humanmedizin gibt es bis heute keinen Anhaltspunkt, dass im MDR1-Gen Polymorphismen vorliegen, welche einen vollständigen Funktionsverlust des MDR1-Transporters verursachen, wie dies aus Experimenten mit *mdr1a*-defizienten CF-1-Mäusen und bei nt230(del4) MDR1-defekten „Ivermectin-sensitiven“ Hunden bekannt ist (Umbenhauer et al., 1997; Mealey et al., 2001).

MDR1-Gendefekt beim Hund

2001 wurde eine 4-bp Deletionsmutante im caninen MDR1-Gen identifiziert, welche in der Literatur unter den synonymen Bezeichnungen *mdr1-1Δ*, *ABCB1-1Δ* oder MDR1 nt230(del4)

zu finden ist (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005; Mealey et al., 2008). Diese MDR1-Mutation bedingt den Phänotyp der Ivermectinsensitivität bei homozygot betroffenen Hunden, welche erstmals 1983 beschrieben wurde (Seward, 1983). Hunde mit homozygoter nt230(del4) MDR1-Mutation exprimieren kein funktionsfähiges P-Glycoprotein. Diese Tiere zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber sonst über MDR1 transportierten Arzneistoffen wie beispielsweise Ivermectin, Moxidectin, Milbemycinoxim, Acepromazin, Butorphanol, Digoxin, Vincristin oder Loperamid (Mealey et al., 2001; Martinez et al., 2008; Mealey et al., 2008; Barbet et al., 2009). Neben dem Collie sind noch zwölf weitere Hunderassen (Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, Border Collie, Old English Sheepdog, Australian Shepherd Miniature, Longhaired Whippet, McNab, Silken Windhound, Deutscher Schäferhund, Weißer Schäferhund/Berger Blanc Suisse, English Shepherd und Wäller) mit unterschiedlich hoher Allelfrequenz von diesem Gendefekt betroffen (Tabelle 1) (Gramer et al., 2011).

Tabelle 1: Rasseverteilung der nt230(del4) MDR1 Mutation

Rasseverteilung MDR1 nt230(del4)	Allelfrequenz MDR1(-) in %
Collie, kurzhaarig	68
Collie, langhaarig	55 - 57
Langhaar Whippet	42 - 65
Australian Shepherd, Miniatur	20 - 50
Shetland Sheepdog	7 - 35
Silken Windhound	18 - 30
Australian Shepherd	17 - 46
McNab	17 - 30
Wäller	17 - 19
Weißer Schäferhund	14
Bobtail	1 - 11
Englischer Schäferhund	7 - 15
Deutscher Schäferhund	6 - 10
Border Collie	1 - 2
Hütehund-Mischlinge	6 - 7
Mischlinge	2 - 7

Je nach Ausprägung des MDR1-Defektes spricht man von heterozygot ($MDR1^{+/-}$) oder homozygot ($MDR1^{-/-}$) betroffenen Hunden, welche einen teilweisen bzw. vollständigen Funktionsverlust des MDR1 P-Glycoproteins aufweisen.

Bis heute wird auch in der Veterinärmedizin an der Identifizierung weiterer Polymorphismen im MDR1-Gen geforscht, da weitere Genvarianten vermutet werden, welche wahrscheinlich ebenfalls die Transportfunktion von P-Glycoprotein beeinträchtigen. Das wissenschaftliche Interesse resultiert aus der Tatsache, dass Hunde, welche eigentlich nicht von der MDR1 nt230(del4) Mutation betroffen sind, mitunter trotzdem gravierende Nebenwirkungen nach der Verabreichung von MDR1-Arzneistoffen wie Makrozyklischen Laktonen oder Zytostatika gezeigt haben.

2010 publizierte z. B. eine koreanische Arbeitsgruppe eine MDR1-Insertionsmutation beim Border Collie (Han et al., 2010). Von diesen Autoren wird eine Insertion der drei Basen AAT, welche zu der Insertion der Aminosäure Asparagin an Position 24 der MDR1-Proteinsequenz führt, für eine Ivermectin-Überempfindlichkeitsreaktion bei einem Border Collie verantwortlich gemacht. Ein kausaler Zusammenhang konnte in dieser Studie allerdings nicht belegt werden. Weitere potenziell relevante Polymorphismen im MDR1-Gen des Hundes sind die SNPs A1595G, A2258T und C2426T, welche zu den Aminosäuresubstitutionen Gln532Arg, Asn753Ile und Pro809Leu führen (Geyer und Janko, 2012).

2.3.3 Polymorphismen im MRP1-Gen

MRP1-Polymorphismen sind vor allem in der Humanmedizin erforscht, während vergleichbare Daten kaum in der Veterinärmedizin zu finden sind. Wie bei der Erforschung der humanen MDR1-Polymorphismen ist auch für das MRP1-Gen die Auswirkung identifizierter SNPs auf die Proteinexpression und –funktion weitestgehend unbekannt. Im Mittelpunkt der Identifizierung von SNPs im MRP1-Gen standen bisher japanische (Fukushima-Uesaka et al., 2007) und chinesische Individuen, während für Kaukasier relativ wenige Daten vorliegen (Kerb, 2006). In der Literatur werden verschiedene Aminosäuresubstitutionen beschrieben, welche *in vitro* die Transportfunktion von MRP1 beeinflussen sollen (Conrad et al., 2001; Conrad et al., 2002). Die erste Substitution, R433S, zieht eine signifikante substratspezifische Alteration der MRP1-Funktion nach sich und ist verantwortlich für eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Doxorubicin (Conrad et al., 2002). Für die zweite Substitution hingegen, G671V, konnte weder ein Effekt auf die Substratspezifität und -effizienz noch auf die Transportfunktion gesehen werden (Conrad et al., 2001). Eine weitere Studie zeigte 2010, dass MRP1-Polymorphismen wie der SNP rs212093 auch Einfluss auf die Pathophysiologie von Lungenerkrankungen wie der COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) haben können (Budelac et al., 2010).

Die identifizierten Polymorphismen und deren Effekte auf das MRP1-Protein machen deutlich, dass SNPs einen signifikanten Einfluss auf die Funktion und Substratspezifität von Transportproteinen und somit auch einen Einfluss auf den Therapieerfolg haben können.

2.4 THERAPIEVERSAGEN DURCH MEDIKAMENTENRESISTENZ

2.4.1 Verschiedene Mechanismen der Therapieresistenz

Die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Arzneistoffen ist die häufigste Ursache für den Misserfolg einer Krebstherapie. In der Vergangenheit wurden einige Faktoren, welche mit einer Arzneistoffresistenz assoziiert sind, in der Human- und Veterinärmedizin untersucht. Die sogenannte Multidrug-Resistenz (MDR) kann sowohl intrinsisch bedingt, also hereditär, oder durch Exposition mit zytotoxischen Substanzen, wie z. B. Zytostatika, erworben sein.

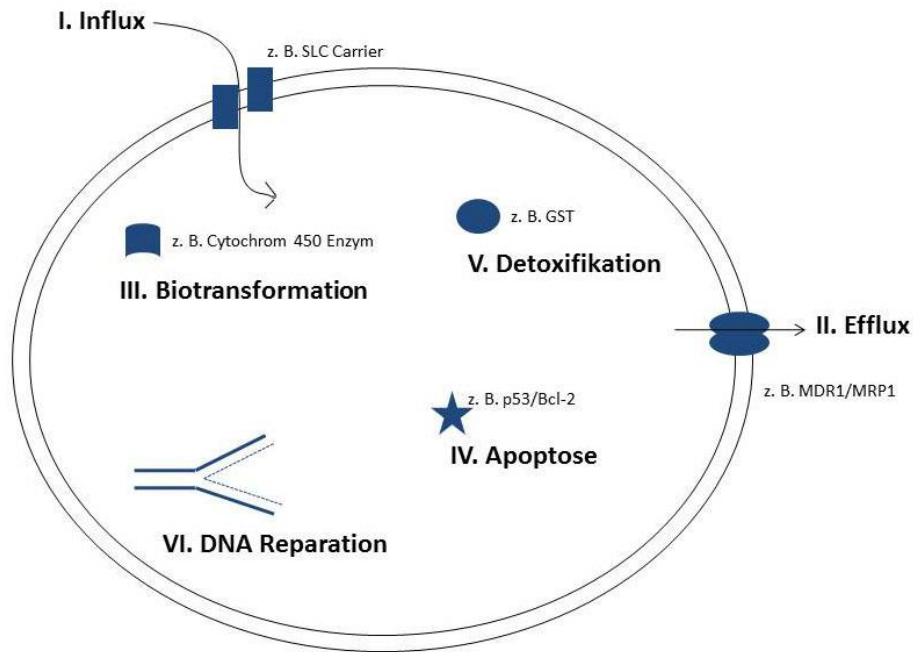


Abbildung 1: Mechanismen der Therapieresistenz

In der Abbildung sind die mit I-VI bezifferten verschiedenen Mechanismen der Resistenzentstehung graphisch dargestellt und an den jeweiligen Reaktionsorten in der Zelle eingezeichnet (SLC=Solute Carrier; GST=Glutathion S-Transferase; p53=Tumorprotein 53; Bcl-2=B-cell lymphoma 2)

Zu diesen Mechanismen gehört erstens, wie in Abbildung 1 dargestellt, ein reduzierter Influx von verschiedenen Substanzen durch eine verminderte Expression von Aufnahmetransportern wie dem organischen Aniontransporter SLC22A1 aus der Familie der Solute Carrier (SLC) (Rochat, 2009). Zweitens begünstigen Effluxtransporter (wie z. B. MDR1 und MRP1), welche von Tumorzellen verstärkt hochreguliert werden können, einen gesteigerten Efflux von Zytostatika (Gottesman et al., 2002; O'Connor, 2007). Außerdem kann eine modifizierte Biotransformation durch XME-Isozyme (tumor expressed Xenobiotic Metabolizing Enzymes) verschiedene zytotoxische Substanzen inaktivieren oder die Aktivierung zu ihrer wirksamen Form verhindern (Rochat, 2009). Zu diesen XME-Isozymen gehören verschiedene Cytochrom P-450 Enzyme (CYPs), welche viele Arzneistoffe, auch Zytostatika, metabolisieren können. Eine verminderte Apoptose kann einerseits durch ein aberrantes p53-Gen (Tumorprotein 53) oder auch durch eine Hochregulation von Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) verursacht werden (Buchholz et al., 2003). Liegt nicht mehr das Wildtyp-p53-Gen vor, kann die Zelltod-Signalkaskade nicht mehr eingeleitet werden. An letzter Stelle stehen eine gesteigerte DNA-Reparation, mit Hilfe derer eine durch alkylierende Zytostatika hervorgerufene Schädigung

behaben werden kann (Schold et al., 1989) sowie eine Detoxifizierung durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) (Moscow und Dixon, 1993).

Abbildung 1 (Seite 13) macht deutlich, dass unterschiedliche Mechanismen in einer Therapieresistenz resultieren können. In der vorliegenden Arbeit wird vornehmlich die Resistenzentwicklung durch die Effluxtransporter MDR1 und MRP1 behandelt.

2.4.2 Therapieresistenz durch MDR1

Eine durch MDR1 vermittelte Therapieresistenz kann einerseits hereditär, zytostatikainduziert oder durch die Applikation von Glukokortikoiden vor einer Chemotherapie bedingt sein (Altuvia et al., 1993; Wu et al., 2011). Die meisten Krebspatienten entwickeln im Verlauf der Therapie eine Resistenz gegenüber bereits eingesetzten Zytostatika oder auch Kreuzresistenzen gegenüber bislang für den Organismus unbekannten Präparaten. Diese Resistenzen führen zumeist zur Progression der Erkrankung (Wu et al., 2011).

Zu den von MDR1 transportierten Zytostatika gehören Vincristin, Doxorubicin, Vinblastin, Actinomycin D, Daunomycin, Paclitaxel, Teniposid, Etoposid und Docetaxel (Luqmani, 2005).

In der Humanmedizin wurde die MDR1-Hochregulation in Tumorzellen sehr genau untersucht und eine Korrelation zwischen Arzneistoff-Resistenz und der Überlebenszeit des Patienten konnte eindeutig hergestellt werden (Cordon-Cardo et al., 1990). Aber auch in einer Studie mit caninen Gewebeproben konnte die MDR1-Expression in verschiedenen epithelialen und mesenchymalen Tumoren durch eine immunhistochemische Untersuchung bestimmt werden (Ginn, 1996). Eine weitere Studie, die mit caninen high-grade Lymphomen eine immunhistochemische Untersuchung durchführte, zeigte, dass das MDR1-Expressionsniveau zu Beginn der Therapie niedriger als bei Tumorprogression war (Bergman et al., 1996). Ebenfalls weisen Tumore eines höheren Grades und mit einer schlechteren Prognose nach Miyoshi et al. bereits vor Therapiebeginn ein höheres MDR1-Expressionsniveau auf als weniger maligne Tumore (Miyoshi et al., 2002). Auch die Ermittlung des MDR1-Expressionsniveaus aus Gewebeproben unterschiedlicher Tumore mittels quantitativer Real-Time PCR führte zu ähnlichen Ergebnissen (Culmsee et al., 2004).

Die veterinärmedizinische Forschung zeigt weiterhin großes Interesse an der MDR1 vermittelten Therapieresistenz und der Entwicklung von Substanzen, welche in der Lage sind diese zu umgehen. Eine Studie führte bei Gewebeproben des caninen malignen Lymphoms Unter-

suchungen mit dem gegen MDR1 gerichteten monoklonalen Antikörper C219 durch und zeigte, dass das MDR1-Expressionsniveau mit der Remissions- und Überlebenszeit zu korrelieren ist (Bergman et al., 1996). Vergleichbar mit dem Non-Hodgkin-Lymphom des Menschen zeigten Lee et al. (1996), dass auch das MDR1-Expressionsniveau beim Hund nach Beendigung der Initialtherapie höher ist als zu Beginn der Behandlung. Moore et al. (1995) konnten anhand von Western Blots mit caninen Lymphomzellen ebenfalls nachweisen, dass die MDR1-Expression am Ende der initialen Chemotherapie höher ist als zu Beginn (Moore et al., 1995).

2.5 KOMPLIKATIONEN DER CHEMOTHERAPIE

Anders als in der Humanmedizin gilt in der Veterinärmedizin der Grundsatz, dass bei Durchführung einer Chemotherapie die Lebensqualität und nicht die Heilung im Vordergrund steht. Daher wird in der Veterinärmedizin in geringeren Dosierungen therapiert, um gravierende Nebenwirkungen zu vermeiden. In der Regel kommt es nur bei einem von vier Tieren überhaupt zu Nebenwirkungen und bei fünf Prozent der therapierten Patienten ist eine stationäre Aufnahme aufgrund einer Sepsis oder Dehydratation erforderlich (Thamm und Vail, 2007). Bei Zytostatika ist jedoch die therapeutische Breite niedriger als bei anderen Medikamenten, sodass auch bei „sicheren“ Dosierungen unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können. Die wichtigsten Nebenwirkungen ergeben sich aus der Tatsache, dass Zytostatika schnell teilende Zellen in unterschiedlichen Zellphasen angreifen und zerstören. Der Zellzyklus untergliedert sich in vier Phasen, die während der Teilung fließend ineinander übergehen (Abbildung 2, Seite 16). Man unterscheidet hierbei die S-Phase, in der die Synthese von DNA erfolgt, die anschließende G2-Phase, bei der es zur Proteinsynthese kommt, die M-Phase, in der die eigentliche Mitose stattfindet, und die G1-Phase, bei welcher bereits RNA und Proteine synthetisiert werden. Alternativ kann der Zellzyklus eine fünfte Phase, die G0-Phase, beinhalten. Hier können Zellen nach der M-Phase den fortlaufenden Zyklus verlassen und sich entweder temporär in der Ruhephase G0 befinden oder sich als terminal differenzierte Zellen etablieren (Kessler, 2005).

Es ist bekannt, dass Alkylantien (z. B. Cyclophosphamid), Platinderivate (z. B. Carboplatin) und Anthrazykline (z. B. Doxorubicin) phasenunspezifisch wirken, also Zellen in jeder Phase zerstören können. Die eben genannten Zytostatikagruppen verhindern die weitere Zelltei-

lung aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen. Alkylantien bauen Alkylgruppen in DNA-Stränge ein, Platinderivate vernetzen einzelne DNA-Moleküle miteinander und Anthrazykline interkalieren in die DNA und binden zudem an die Topoisomerase II α , ein Enzym, welches für die Zellteilung von Bedeutung ist. Vincaalkaloide (z. B. Vincristin) hingegen greifen Zellen in der M-Phase an, indem die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli verhindert und somit der Aufbau des Spindelapparates blockiert wird. Antimetaboliten (z. B. Cytarabin) zeigen ihre Wirkung in der S-Phase durch eine kompetitive Hemmung physiologischer Zellzyklus-Enzyme. Diese letzten beiden Zytostatikagruppen sind demnach phasenspezifisch (Kessler, 2005).

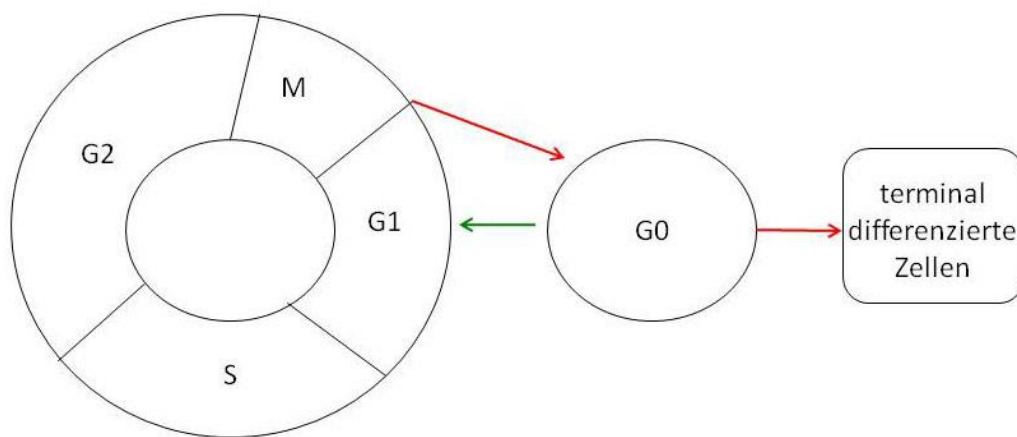


Abbildung 2: Zellzyklus und Zytostatika

M=Mitose-Phase; G0=Ruhephase; G1=Synthese von RNA und Proteinen; S=DNA-Synthese; G2=Synthese von Proteinen für die Zellteilung

Nebenwirkungen, die durch die Zerstörung von sich schnell teilenden Zellen entstehen, sind vor allem die Knochenmarksuppression und die gastrointestinale Toxizität (Tomiya et al., 2010). Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin hat sich gezeigt, dass der Einsatz einer geeigneten Prophylaxe stets wichtiger ist als die Therapie bereits vorhandener Nebenwirkungen, da diese oftmals schwierig und langwierig zu behandeln sind. Zur Standardisierung der Nebenwirkungsklassifizierung und um diese besser einschätzen und behandeln zu können, gibt es verschiedene, nach Toxizität gestaffelte Gradeinteilungen der WHO und der VCOG (Victorian Cooperative Oncology Group) sowie die „Common Toxicity Criteria“ (Miller et al., 1981; Franklin et al., 1994; Anon, 2004; Ferrell et al., 2008). Diese Scoring-Systeme beurteilen den Toxizitätsgrad und geben Auskunft über eine notwendige Therapie von Nebenwirkungen und prophylaktische Optionen. Anhand von Gradeinteilungen wurde

für diese Dissertation das VCOG Schema verwendet (Tabelle 8, Seite 26). Bei einer geeigneten Intervention, beispielsweise mittels Dosisreduktion oder prophylaktischer Medikation mit Antiemetika, Spasmolytika und Diuretika, kommt es nur bei einem von 100 Patienten zu fatalen Nebenwirkungen.

2.5.1 Myelosuppression

Neutropenie ist die am häufigsten auftretende Myelosuppression. Diese tritt ca. sieben bis zehn Tage nach Beginn der Chemotherapie auf, in Ausnahmefällen auch schon nach vier bis fünf Tagen bei Vinblastin- und Paclitaxelgabe oder erst nach zwei bis drei Wochen bei Verabreichung von Carboplatin (Vail, 2009). Dies hängt mit der Halbwertszeit dieser Zellen im Blut von vier bis acht Stunden und der Reifungszeit von ca. sechs Tagen im Knochenmark zusammen. Per definitionem liegt eine Neutropenie bei weniger als 3.000 Neutrophilen pro μl Blut vor. Klinische Symptome durch eine Infektion treten beim Hund meist erst bei weniger als 500 Neutrophilen pro μl Blut auf. Hier besteht die Gefahr einer akuten Sepsis und Patienten müssen stationär aufgenommen werden, um intensivmedizinisch betreut zu werden. In der Folge kann es zum Auftreten von Fieber, Tachykardie, Hypovolämie, rötlich-verwaschenen Schleimhäuten, Vomitus, Diarrhoe und/oder Hyper- oder Hypoglykämie kommen. Das Auftreten einer Neutropenie geht zumeist mit gastrointestinalen Symptomen, die durch die Schädigung des Intestinalepithels hervorgerufen werden, einher (Richardson und Dobish, 2007). Durch diese im Darm entstehenden Mikroulcerationen kann es zu einem Übertritt von Bakterien in die Blutbahn kommen, so dass eine Bakteriämie mit Sepsis die Folge ist. Weitere myelosuppressive Eigenschaften von Zytostatika, die jedoch weitaus seltener und klinisch oftmals unbedeutend auftreten, sind die Thrombozytopenie, welche zumeist von Lomustin hervorgerufen wird (Heading et al., 2011), und die Anämie. Dies liegt an der längeren Überlebenszeit der Erythrozyten (ca. 110 Tage) und Thrombozyten (ca. sieben bis 12 Tage) im Blut.

2.5.2 Gastrointestinale Toxizität

Die meisten Zytostatika verursachen neben einer Myelosuppression auch eine gastrointestinale Toxizität in Form von Vomitus, Diarrhoe oder seltener auch einer hämorrhagischen Colitis (Doxorubicin) oder Zystitis (Cyclophosphamid). Zumeist verlaufen gastrointestinale Nebenwirkungen mild bis moderat und sind selbstlimitierend. Akute Symptome treten innerhalb von 24 Stunden auf und sind meist mit einer Cisplatin-, Irinotecan- oder 5-Fluorouracil-Applikation assoziiert (Richardson und Dobish, 2007). Die verzögert auftretenden Symptome nach zwei bis fünf Tagen entstehen durch Schleimhautirritation oder eine Entzündung der Magen-Darm-Mukosa (Vail, 2009). Darüber hinaus kann das Präparat Doxorubicin beim Hund zu einer hämorrhagischen Colitis führen, welche eine schwere Dehydratation zur Folge haben kann. Weiterhin kann auch die Chemorezeptor-Triggerzone im Gehirn beteiligt sein, die ebenfalls zu den komplexen Mechanismen der gastrointestinalen Toxizität beiträgt. Eine hämorrhagische Zystitis ist im Zuge einer Chemotherapie äußerst selten und wird z. B. durch Acrolein, einem Abbauprodukt des Cyclophosphamids verursacht. Acrolein entsteht bei der hepatischen Metabolisierung und führt zu Irritationen der Blasenschleimhaut (Marin et al., 1996).

Ist bereits bekannt, dass ein bestimmter Patient mit starken Nebenwirkungen auf ein Präparat reagiert oder ist das Potential einer Substanz Nebenwirkungen auszulösen sehr hoch, sollte unbedingt eine prophylaktische Versorgung mit Antiemetika, Spasmolytika und Diuretika erfolgen (Kessler, 2005; Vail et al, 2007).

2.6 TYROSINKINASEINHIBITOREN

2.6.1 Charakterisierung des cKIT-Gens

Proteinkinasen sind Enzyme, die für fast jeden biologischen Prozess von Bedeutung sind, unter anderem für Apoptose, Zellzyklusprogression und –proliferation, das Zytoskelett, Zelldifferenzierung, Immunantwort, Funktion des Nervensystems und die Transkription (Cohen et al., 1994). Zu unterscheiden sind die Protein-Serinkinasen von den Protein-Tyrosinkinasen, zu denen die in dieser Studie analysierte Rezeptor-Tyrosinkinase cKIT gehört (Fantl et al., 1993). Erstmalig wurde cKIT als zelluläres Protoonkogen-Homolog des viralen Onkogens v-KIT des Hardy-Zuckerman 4-felinen Sarkomvirus identifiziert (Besmer et al., 1986; London et

al., 1999). An die cKIT Tyrosinkinase bindet der sogenannte Stammzellfaktor (SCF), welcher als physiologischer Ligand identifiziert wurde. CKIT besteht aus einer extrazellulären ligand-bindenden Domäne, einem einzelnen Transmembransegment und einer zytoplasmatischen Kinase-Domäne (Abbildung 3, Seite 20).

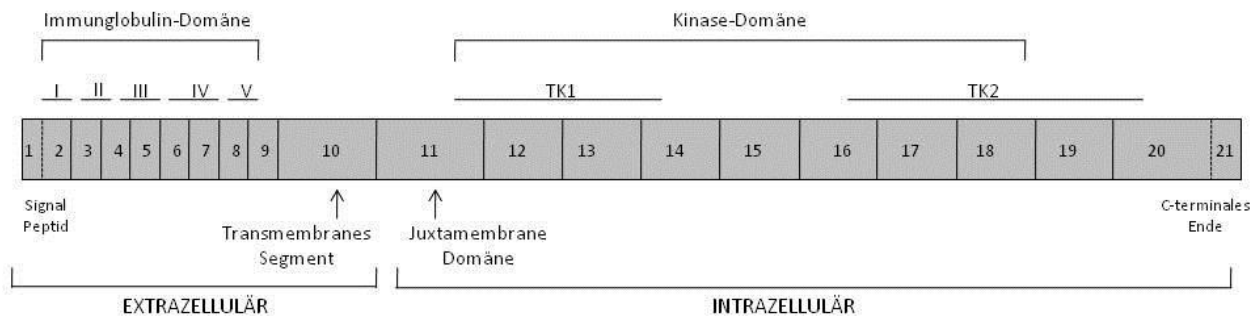


Abbildung 3: Organisation der cKIT Rezeptortyrosinkinase

Die Exone 1-21 des cKIT Gens sind in den obenstehenden Boxen aufgelistet. Die Pfeile markieren das Transmembranesegment und die Juxtamembran-Domäne des cKIT-Rezeptors. In Exon 1 wird das Signal Peptid kodiert, die Kinase-Domänen liegen in den Exonen 11-14 (TK1) und 16-20 (TK2). Die Immunoglobulin-Domäne ist extrazellulär orientiert. I-V=Immunoglobulin-Domänen; TK1=Tyrosinkinase-Domäne 1; TK2=Tyrosinkinase-Domäne 2

Der Stammzellfaktor bindet an die zweite und dritte Immunoglobulin-Domäne und führt somit zu einer Rezeptordimerisierung und Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen. Der autophosphorylierte Rezeptor führt schließlich zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, sodass es in der Folge zu Erythropoese, Lymphopoese, Mastzell-Entwicklung, Megakaryopoese, Gametogenese und Melanogenese kommen kann (Broudy, 1997; Ma et al., 1999; Roskoski, 2005).

2.6.2 Mutationen im cKIT-Gen

Aus Kapitel 2.6.1 geht hervor, dass die Rezeptortyrosinkinase cKIT für zahlreiche Zellprozesse verantwortlich ist, so dass die Regulation dieses Proteins bedeutend für dessen Aktivität ist. Es ist in der Literatur beschrieben, dass eine aberrante Aktivität von cKIT eine Reihe von Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, autoimmune, kardiovaskuläre, inflammatorische und nervale Erkrankungen nach sich ziehen kann (Krystal et al., 1996). Es ist weiterhin bekannt, dass zahlreiche Tumore beim Menschen wie der kleinzellige Lungenkrebs, das kolorektale Karzinom, Brustkrebs, gynäkologische Tumore und Neuroblastome die cKIT-Aktivität durch eine autokrine Sekretion von SCF steigern können (Bellone et al., 1997; Krystal et al., 1996). Ein weiterer Mechanismus, durch den die cKIT-Aktivität gesteigert werden kann, sind sogenannte „gain-of-function“ Mutationen (Kitayama et al., 1995). Diese führen zu einer dauerhaften Aktivierung von cKIT, ohne dass der physiologische Ligand SCF binden muss. Eine Deaktivierung des Rezeptors ist dann nicht mehr möglich. In der Humanmedizin sind derartige Muta-

tionen für gastrointestinale Stromatumore, die akute myeloische Leukämie, das sinonasale T-Zell-Lymphom, Mastozytose, Seminome und Dysgerminome beschrieben (Roskoski, 2005). In der Veterinärmedizin sind diese Mutationen bislang nur für den caninen Mastzelltumor (Jones et al., 2004; Riva et al., 2005; Webster et al., 2006), canine Leukämieformen (Usher et al., 2009) und canine gastrointestinale Stromatumore (Gregory-Bryson et al., 2010) nachgewiesen worden. In einer Studie von London et al. (1999) wurde eine „GNSK“ Insertion in der cKIT-Sequenz des Hundes ermittelt, während eine Deletion von „GNSK“ in der sog. C2-Zelllinie, einer caninen Mastozytomzelllinie, und im normalen Maus-cKIT-Gen nachgewiesen wurde. Es wird diskutiert, ob es sich hierbei um eine natürliche Splicevariante handelt oder ob die „GNSK“ Deletion wie in der C2-Zelllinie zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von cKIT in Abwesenheit von SCF führt (London et al., 1999).

Im humanen cKIT-Gen wurden Mutationen zumeist im Exon 17 nachgewiesen (Roskoski, 2005), während der Großteil der Mutationen im cKIT des Hundes in den Exonen acht, neun und elf gefunden wurden (Letard et al., 2008).

2.6.3 Tyrosinkinaseinhibitoren als neue Therapieoption in der Veterinär-onkologie

Die in der Veterinärmedizin identifizierten aktivierenden Mutationen im cKIT-Gen indizieren eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) (Pytel et al., 2009). TKIs stellen eine spezifische Target-Therapie dar, welche die ATP-Bindungsstelle am Tyrosinkinaserzeptor blockiert. Auf diese Weise wird nicht, wie bei einer konventionellen Chemotherapie, eine Vielfalt an sich schnell teilender Zellen (Epithelzellen, myeloische Zellen und gastrointestinale Zellen) zerstört.

Bereits seit Jahren finden die TKIs Anwendung in der Humanmedizin. Zu diesen gehören im Wesentlichen Imatinib, Sunitinib und Gefitinib (Moen et al., 2007). Erst seit wenigen Jahren sind die TKIs auch in der Veterinärmedizin etabliert. Im November 2008 erhielt das Präparat Masivet® (AB Science) mit dem Wirkstoff Masitinib die Zulassung für die Behandlung von Hunden mit inoperablen Mastzelltumoren der Grade II und III europaweit. Palladia® (Pfizer) mit dem Wirkstoff Toseranib ist ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor, der seit 2007 in den USA und seit 2010 auch in Deutschland zugelassen ist. Studien mit diesen Medikamenten zeigen eine Korrelation zwischen bestimmten cKIT-Mutationen, Tumorgrad, der medianen Überlebenszeit und dem Therapieerfolg (Webster et al., 2004). Weniger gut differenzierte Mastzelltumore (Grad II-III), die eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine cKIT-Mutation aufweisen,

sprechen mit einer höheren Erfolgsrate auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren an (Gleixner et al., 2007) als ausdifferenzierte Mastzelltumore (Grad I).

Derzeit forschen verschiedene Unternehmen mit großem Interesse auf dem Gebiet der humanen und caninen Tyrosinkinasen sowie an der Entwicklung neuer TKIs. So werden auch andere Kinasen, wie *Met* (eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase), hinsichtlich ihrer Bedeutung für canine Tumorformen erforscht. Darüber hinaus wird auch die Wirksamkeit von etablierten TKIs, wie beispielsweise Toceranib, bei anderen Tumorformen, wie z. B. dem lingualen Plattenepithelkarzinom von Hund und Katze, untersucht (Liao et al., 2007).

Mittlerweile gilt die Therapie von Leukämie- und Mastzelltumorpacienten mit TKIs (Imatinib, Masitinib, Toceranib) sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als Goldstandard möglicher Therapieoptionen (Gurney et al., 2007; Hahn et al., 2008).

3 Material

3.1 MATERIALIEN FÜR DIE SEQUENZANALYSE

3.1.1 Primer für die Sequenzierung

MDR1

Tabelle 2: Primer für die full-length Amplifikation des caninen MDR1-Transkriptes

Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')
MDR1-F1	64,2	AAGGAAAGCCCGAGGTGACGATG
MDR1-R1	64,2	CTGTCTGCCCACTCTGAACCTTC
MDR1-F2	63,0	CGCAAGAGGAGCAGCTTATGAAATC
MDR1-R2	64,4	GGATCTCCCCAGCTTTGCCAAATG
MDR1-F3	63,0	GGAGGATTCTGAAGCTGAACTCAAC
MDR1-R3	64,2	GGATGTCTGGTCGAGTGGGATAG
MDR1-F4	63,0	CACACATCTTCGGGGTCTCATTTTC
MDR1-R4	64,4	CGGCCACAGTTCACTAGCGTTTTG

Die oben aufgeführten Primer wurden bereits im Rahmen einer anderen Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durch Jasmin Kranz etabliert und aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

MRP1**Tabelle 3: Primer für die full-length Amplifikation des caninen MRP1-Transkriptes**

Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')
MRP1-F1	68,0	CCCGCCGCATGGCGCTCC
MRP1-R1	72,0	GGCCAGGTCCATGAACCGCTGGG
MRP1-F2	72,0	CAAGACAGCCGTCATCGGGGCCG
MRP1-R2	72,0	TGTGCGTGACCAGGAGCCGCGTC
MRP1-F3	74,0	GGGCGTGAACCTGTCTGGGGGCC
MRP1-R3	72,0	AGGCACGGATGACGCTGACCCCC
MRP1-F4	72,0	TGCTGGCCACTCCCATCGCCTCC
MRP1-R4 (1)	72,0	GCTCCAGGGCTCACACCAGGCCA
MRP1-R4 (2)	72,0	ACGGGAACGCACCAGCTCCAGGG

Diese Primer wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals etabliert. Sie sind spezifisch für das canine MRP1-Gen und haben eine Länge von 18 bis 23 bp. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurden zwei unterschiedliche Rückwärtsprimer R4 verwendet, um individuelle Sequenzierungsunterschiede einzelner Hunde zu berücksichtigen. Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried) synthetisiert.

cKIT**Tabelle 4: Primer für die full-length Amplifikation des caninen cKIT- Transkriptes**

Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')
cKIT-F1 (1)	69,0	AGCTCAGAGTCTATCGCAGCCACC
cKIT-F1 (2)	68,0	CTCAGAGTCTATCGCAGCCACCG
cKIT-R1 (1)	70,0	CTCGCAGATCTCCTTTGTCTGCCTTG
cKIT-R1 (2)	66,0	ATAGATCCACTGCTGGTGCTCCG
cKIT-F2	69,0	GAATCTTCTTGGAGCGTGACCGTTG
cKIT-R2	69,0	CAGCATCCCAGCACGTCTTCATGATG
cKIT-F3	66,0	GGGCCCACCTTGGTCATTACAG
cKIT-R3	66,0	AGGATGCAAGCCGAAGGAGGAC

Wie die MRP1-Primer wurden auch diese Primer im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die Primer sind spezifisch für das canine cKIT-Gen und haben zwischen 24 und 27 Basen. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, liegen auch hier zwei verschiedene Vor- und Rückwärtsprimer (F1, R1) vor. Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried) synthetisiert.

3.1.2 Polymerasen und kommerziell erhältliche Kits, sonstige Materialien

Tabelle 5: Materialien für die Sequenzanalyse

DNA-Polymerase (hitzebeständig)	
FastStart High Fidelity PCR System → Mischung aus thermostabiler proofreading Polymerase (3'→ 5' Exonuklease Aktivität) und thermostabiler Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Kommerziell erhältliche Kits	
RiboPure Blood Kit (RNA-Isolierung aus Blut)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolierung aus Gewebe)	Qiagen GmbH, Hilden
SuperScript III First Strand Synthesis System (cDNA Synthese)	Invitrogen, Karlsruhe
HiYield PCR Clean-up & Gel-Extraction Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Sonstige Materialien	
RNA/later RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
Wasser für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe

3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

3.2.1 Native-Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Tabelle 6: Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Gehalt
6 x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Xylen Cyanol FF	0,03 %	
	Glycerin	60 %	
	EDTA	60 mM	
10 x TAE Puffer (1l)	Tris	400 mM	484 g
	Essigsäure		114,2 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	100 mM	400 ml
	→ als 1 x verwenden		
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	1 µg/µl	
1,5 % Agarosegel	Agarose		1,5 g
	1 x TAE Puffer		100 ml

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) Zusammensetzung: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp

3.3 MATERIALIEN FÜR DIE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

3.3.1 TaqMan Gene Expression Assays für die quantitative Real Time PCR

Tabelle 7: TaqMan Gene Expression Assays

Bezeichnung	Assay-ID	Amplicon-Länge
ABCB1	Cf_02693309_m1	100
SDHA	Cf_02664982_m1	83
HPRT1	Cf_02626256_m1	102

Alle drei Assays sind spezifisch für den Hund und wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) synthetisiert. Als Komponenten enthält jeder der Gene Expression Assays zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation und eine FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde.

3.3.2 TaqMan Gene Expression Master Mix

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP (Ultrarein)
 Uracil-DNA Glycosylase (UDG)
 dNTPs mit Deoxyuridintriphosphat (dUTP)
 ROX als Referenzfarbstoff
 optimierte Pufferkomponenten

3.3.3 Sonstiges Material

Die Endonuklease DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde zusammen mit einem 10 x Reaktionspuffer mit $MgCl_2$ und EDTA zum Verdau von einzel- und doppelsträngiger DNA verwendet.

3.4 MATERIALIEN UND EDV-PROGRAMME ZUR STATISTISCHEN AUSWERTUNG

3.4.1 Material

Fragebogen: Tierart (Hund) und Rasse
 Alter
 Diagnose (malignes Lymphom, anatomisch/klinisches Stadium, Subtyp)
 Therapieprotokoll mit Zytostatika-Dosierung
 Auftreten von Nebenwirkungen (Diarrhoe, Vomitus, Blutbildveränderungen)
 Prophylaxe (Medikament und Dosierung)
 Unterschrift des Patientenbesitzers

Die für diese Studie entwickelten Fragebögen (s. Anhang II-III, Seite 130-133) wurden jedem Patientenbesitzer bei der Erstuntersuchung zur Erfassung des Allgemeinzustandes (Anhang II, Seite 130-131) und nach jeder weiteren Zytostatika-Applikation (Anhang III, Seite 132-133)

zum Ausfüllen ausgehändigt. Auf diese Weise wurde ein regelmäßiges Monitoring der Patienten hinsichtlich des Allgemeinzustandes und vor allem der gastrointestinalen Symptome möglich. Mit der jeweils geleisteten Unterschrift des Besitzers erklärte sich dieser mit der Teilnahme an der Studie einverstanden. Die hämatologischen Parameter des Patienten nach einer Chemotherapie wurde mit Hilfe des Blutbildes erfasst, nach Toxizitätsgraden eingeteilt (Tabelle 8) und nach Anhang I (Seite 129) evaluiert.

Tabelle 8: Gradeinteilungen nach Toxizität

Diese Gradeinteilung wurde eigens für diese Arbeit, modifiziert nach WHO-Einteilung und VCOG-Schema, erstellt. Bei der Gradeinteilung der Neutropenie wurde speziell für diese Arbeit ein zusätzlicher Grad definiert, 1*. Dieser Grad legt einen Referenzbereich für neutrophile Granulozyten fest, der per definitionem der WHO keine Neutropenie darstellt. Dennoch wurde dieser Grad in dieser Arbeit eingeführt, da aus Sicherheitsgründen bei Hunden mit diesen Werten keine Chemotherapie in der Tierklinik Hofheim durchgeführt wurde.

		Gradeinteilung	Referenzwerte Hund
Knochenmark-Suppression	Neutropenie	1*	$3,0 - 2,5 \times 10^9/\text{L}$
		1	$2,5 - 2,0 \times 10^9/\text{L}$
		2	$2,0 - 1,5 \times 10^9/\text{L}$
		3	$1,5 - 1,0 \times 10^9/\text{L}$
		4	$1,0 - 0,5 \times 10^9/\text{L}$
		5	$< 0,5 \times 10^9/\text{L}$
	Thrombozytopenie	1	$100 \times 10^9/\text{L} - < \text{LLN}$
		2	$100 - 50 \times 10^9/\text{L}$
		3	$50 - 25 \times 10^9/\text{L}$
		4	$< 25 \times 10^9/\text{L}$
	Hämoglobin	1	$100 \text{ g/L} - < \text{LLN}$
		2	$100 - 80 \text{ g/L}$
		3	$80 - 65 \text{ g/L}$
		4	$< 65 \text{ g/L}$
Gastrointestinal	Diarrhoe	1	2 – 6 x/Tag ohne Prophylaxe
		2	2 – 6 x/Tag mit Prophylaxe
		3	> 6 x/Tag mit Blutbeimengungen
		4	stationäre Aufnahme
	Vomitus	1	3 – 5 x/Tag ohne Prophylaxe
		2	3 – 5 x/Tag mit Prophylaxe
		3	> 5 x/Tag
		4	stationäre Aufnahme

Tabelle 8: Fortsetzung

Haare	Alopezie	1	Haarverlust, lokales Ausdünnen
		2	Ausdünnen generalisiert
		3	Haarverlust generalisiert

3.4.2 EDV-Programme

Statistische Auswertung mit:

- Graph Pad Prism 4
- Microsoft Office Excel 2007

3.4.3 Bioinformatische Datenbanken

ACOMED statistik
<http://www.acomed-statistik.de/cut-off.html>

Definition Cut-Off-Wert

BLAST, NCBI
www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Vergleich von Sequenzen gegen Datenbank

ClustalW
www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

Sequenzalignments

DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA
 EditSeq
 MegAlign

Bearbeiten von Sequenzen
 Sequenzvergleich und Alignments

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute
www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html

Datenbankportal Europa

Ensembl, EBI
www.ensembl.org

Gen Browser

FinchTV (Geospiza)
www.geospiza.com/finchtv/

Visualisieren von Sequenzspuren

GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA
www.graphpad.com/prism/pdemo.htm

Berechnung und Darstellung von Graphiken, Kinetiken, statistische Auswertung

NCBI
www.ncbi.nlm.nih.gov/

Datenbankportal des National Center for Biotechnology Information, USA
 (Literaturrecherche)

Oligo 4.0 (Wojciech Rychlik, Oslo, Norwegen)	Primerauswahl
PolyPhen http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/	Voraussage funktioneller Effekte von Aminosäuresubstitutionen
SIFT Single Protein Sequence Sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html	Voraussage funktioneller Effekte von Aminosäuresubstitutionen
SNP Datenbank www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/	Suche von Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)
UniProt www.uniprot.org/	Angabe der Lokalisation von Genmotiven

3.5 CHEMISCHE SUBSTANZEN

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
EtOH (> 99,8 %)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
RNA <i>later</i> Solution	Applied-Biosystems, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe

3.6 GERÄTE

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA
AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
Aesculap GT 420	Onlinezoo, Wien
Aspirationspistole "Zyto-Gun"	Fa. Seil, Viernheim
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Counter, elektronisches Blutbildzählgerät	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön
Eis-Maschine	Ziegra, Isernhagen
Electrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
14,5 x 6,5 cm	
35,5 x 11,0 cm	
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
12 x 18 cm	
7,5 x 5 cm	
Heizblock 91-D1200	PeqLab, Erlangen
High Temperature Vasectomy Elongated Tip Cautery	Select Medical Products Inc., Florida
Image Master	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK

LabAid	Fermentas, St. Leon-Rot
Leica DFC320 Digital Camera system	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer; Typ MR 82	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Microwelle Plus; Typ HFT 420	Siemens AG, München
Multi-viewing Microscope, N-510	Cosmo Laboratory Equipment, Haryana, Indien
Operationsbesteck	diverse
PerfectSpinP	PeqLab, Erlangen
Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400	PerkinElmer, Weiterstadt
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich, Schweiz
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Werkstatt MZI, Gießen
Sysmex XT-2000i	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	PeqLab, Erlangen
Ultra-Turrax-Homogenisator T25	IKA, Staufen
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Wärmeschränk	Melag, Berlin
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5471	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit Rotor SS34	Du Pont, Bad Homburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-60M mit Rotor 50Ti, SW41 und	TFT 45 Beckman Coulter, Krefeld

3.7 VERBRAUCHSMATERIAL

CutaSept F	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Deckgläser, 24 x 60 mm	VWR GmbH, Darmstadt

EDTA KE/1.3	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Einmalkanüle, 20 G x 11/2"; 22 G x 11/4"	WDT eG, Garbsen
Einmalspritze, 1 ml	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einmalspritze Norm-Ject, 10 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Filterspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	NerbePlus GmbH, Winsen/Luhe
Haema-Schnell-Färbung	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
Haematokrit-Kapillaren	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Lidocainhydrochlorid 2%	bela-pharm GmbH & Co KG, Vechta
MicroAmp Optical 96 well Reaktionsplatte	
MicroAmp Optical 48 well Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Singapur
Rotiprotect-Latex Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger, 76 x 26 mm	Servipraxis mediware, Wesel
Pasteurpipetten, Plastik	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
Pasteurpipetten Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
PCR-tubes, 0,2 ml	ABgene, Epsom, UK
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2; 15; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
RNase away	Molecular BioProducts, San Diego, CA
RNase ZapWipes	Ambion, Darmstadt
Tissue-Box	Roth, Karlsruhe
UV-transparente Küvetten (12,5 x 12,5 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht

4 Methoden

4.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die grundlegenden molekularbiologischen Methoden, welche in dieser Arbeit angewendet wurden, werden im Folgenden erläutert.

4.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Je 5 µl der zu messenden RNA wurden mit 95 µl RNase freiem Wasser verdünnt, in eine Küvette überführt und im Photometer (Eppendorf) die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Als Leerwert diente hierbei Wasser in einer Gesamtmenge von 100 µl.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{OD_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient; $E_{\text{DNA}} = 50 \mu\text{g}$; $E_{\text{RNA}} = 40 \mu\text{g}$

Zudem wurde die Reinheit der RNA durch Bestimmung der OD_{280} ermittelt. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} sollte für RNA bei über 1,8 liegen.

4.1.2 DNase I

DNase I (Deoxyribonuclease I; Fermentas) ist eine Endonuklease, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA abbaut. In dieser Arbeit wurde das nachfolgende Protokoll für die Aufreinigung von RNA verwendet, deren cDNA schließlich für die quantitative RT-PCR eingesetzt wurde.

In einem RNase freien 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 1 µg RNA, in der Regel in einem Volumen von 8 µl, mit 1 µl 10x *Reaction Buffer* mit MgCl_2 und 1 µl DNase I vermischt. Es folgte eine Inkubation des Probengemisches bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde das Proben-

gemisch mit 1 µl 25 mM EDTA versetzt und bei 65°C für 10 min inkubiert. Dann erfolgte die cDNA-Synthese mit jeweils 8 µl der DNA-freien RNA.

4.1.3 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung, Charakterisierung und Identifizierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte durch eine native Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden standardmäßig 1%ige Agarosegele verwendet, die eine gute Auftrennung von 500-10.000 bp langen DNA-Fragmenten ermöglichen. 1 g Agarose wurde in der Mikrowelle durch Kochen in 100 ml 1 x TAE gelöst und nach leichtem Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel gegossen. Das erhärtete Gel wurde in eine mit 1 x TAE (Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und es wurden die mit 6 x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) vermischten Proben auf das Gel aufgetragen. Hierbei wurden jeweils 10 µl der DNA-Lösung eingesetzt. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente diente der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth). Die Gelelektrophorese erfolgte bei fünf bis zehn V/cm über 45-90 Minuten bis die Bromphenolblaufront drei Viertel des Gels durchlaufen hatte. Im Anschluss daran wurden kleine Gele (7,5 x 5 cm) 15 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl) gefärbt, während große Gele (12 x 18 cm) 30 min in der Lösung gefärbt wurden. Die kleinen und großen Gele wurden zehn bzw. 20 min gewässert und anschließend im Image Master (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) fotografiert.

4.1.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten aus PCR-Ansätzen erfolgte mit Hilfe des *Hi Yield Gel/PCR DNA Fragments Kit*. Zunächst wurden fünf Teile des *DF Buffer* zu einem Teil der PCR Probe gegeben und im Vortexgerät vermischt. Anschließend wurde das Probengemisch auf eine *DF Column* pipettiert und bei 13.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde daraufhin verworfen und 600 µl *Wash Buffer*, welcher zudem Ethanol enthielt, in die *DF Column* gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13.000 rpm für 30 s) wurde der Durchfluss wiederum verworfen und die Zentrifugation für 3 min zum Trocknen der *DF Column* Matrix bei gleicher Geschwindigkeit wiederholt. Dann wurde die *DF Column* in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution des PCR-Amplifikates erfolgte mit Hilfe von 40 µl *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei 25°C) durch eine Zentrifugation bei 13.000

rpm über 2 min Die Überprüfung der aufgereinigten DNA erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese.

4.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das *Hi Yield Gel/PCR DNA Fragments Kit* diente ebenfalls zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel (s. 4.1.3) wurde unter einem UV-Transilluminator betrachtet, die entsprechende Gelbande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu der Probe wurden 500 µl des *DF Buffer* gegeben und gut mit Hilfe eines Vortexgerätes vermischt. Hinsichtlich der Geldissoziation erfolgte nun eine Inkubation des Probengemisches bei 55 bis 60°C für 10 bis 15 min. Nach Abkühlen des gelösten Probengemisches bei Raumtemperatur wurden 800 µl von diesem in einen *DF Column* pipettiert und bei 13.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Dann wurde der Durchfluss verworfen und es folgten zwei Zentrifugations-Waschschritte mit jeweils 600 µl *Wash Buffer* mit Ethanol, zwischen welchen der Durchfluss wiederum verworfen wurde. Die Elution der PCR-Fragmente wurde mit 40 µl *Elution Buffer* bei einer Geschwindigkeit von 13.000 rpm für 2 min in der Tischzentrifuge durchgeführt. Die Überprüfung der aufgereinigten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese.

4.2 PROBENACQUISITION, PROBENGEWINNUNG UND TUMORIDENTIFIZIERUNG

4.2.1 Acquisition von Blut- und Gewebeproben

Für die Probenacquisition wurden über den Zeitraum von 15 Monaten Blut- und Gewebeproben aus der Tierklinik Hofheim gesammelt. Dabei handelte es sich stets um Material, welches für diagnostische Zwecke oder im Zuge der klinischen Überwachung der Patienten gewonnen wurde. Für die vorliegende Studie wurde lediglich überschüssiges Material aus diesen Vorgängen verwendet, ohne dass für diese Studie eine zusätzliche Probennahme erfolgte oder mehr Material (Blut- und Gewebeproben) wie üblich entnommen wurde. Aus diesem Grund war für diese Studie nach Rücksprache mit dem zuständigen Regierungspräsidium kein Genehmigungsverfahren im Sinne von § 1, Abschnitt 1 des Tierschutzgesetzes notwendig. Blutproben wurden ausschließlich von Lymphompatienten gewonnen, welche

mit einem Therapieprotokoll (Tabelle 9), bestehend aus L-Asparaginase, Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid, Lomustin oder einer anderen Kombination der genannten Präparate, initial therapiert wurden.

Tabelle 9: Initiales Chemotherapieprotokoll der Tierklinik Hofheim

Die unterbrochene Linienführung in der untenstehenden Tabelle deutet an, dass Lomustin und Ara-Cell nie zusammen im Zyklus verwendet wurden, sondern entweder das eine oder andere Präparat. Lomustin wurde stets bei T-Zell-Lymphomen und partiellen Remissionen eingesetzt. In der Diskussion ist das hier als Initiales Chemotherapieprotokoll bezeichnete oftmals als Hofheimer Protokoll II zu finden.

Zytostatika	Tag						
	1	3	10	20	20 - 24	32	40
Vincristin	X						
L-Asparaginase		X				x	
Cyclophosphamid			X				
Ara-Cell					X		
Lomustin				X			
Doxorubicin							X

Routinemäßig wurde vor jeder Medikamentenapplikation, welche intravenös, subkutan, intramuskulär oder oral erfolgte, eine Blutprobe entnommen. So wurden pro Lymphompatienten, welcher in vier Zyklen über einen Zeitraum von ca. fünf Monaten therapiert wurde, ca. fünf Proben pro Hund gesammelt. Auf diese Weise konnte über die gesamte Therapiezeit ein Monitoring gewährleistet werden. Zusätzlich wurden Blutproben von caninen Lymphompatienten acquiriert, welche starke Nebenwirkungen in Form einer gastrointestinalen Symptomatik (Vomitus, Diarrhoe) oder einer Knochenmarksuppression (Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie) entwickelten.

Bei den Gewebeproben handelte es sich um TruCut-Biopsien oder Stanzbiopsien von Lymphomen, Melanomen, Hämangiosarkomen und Osteosarkomen sowie um Proben aus nicht-tumorösen entzündlich veränderten Geweben.

4.2.2 Bestimmung von Lymphoblasten im Blutaussstrich

Lymphoblasten sind morphologisch unreife Lymphozyten, die sowohl bei der akuten Leukämie als auch beim malignen Lymphom Stadium V auftreten. Die Diagnose „malignes Lymphom“ wurde bei den Studienpatienten zytologisch und/oder histologisch gestellt.

Zur zytologischen Diagnostizierung eines malignen Lymphoms wurde mit Hilfe einer Blutkapillare ein Tropfen EDTA-Blut, ca. 5 mm im Durchmesser, auf einen Objektträger gegeben. Dieser wurde mittels eines Deckglases verstrichen, so dass eine Ausstrich-Fahne sichtbar wurde, in welcher die Zellbeurteilung erfolgte. In diesem Ausstrich wurden folgende Zellen unterschieden:

Tabelle 10: Zellen des caninen Blutes

Bezeichnung	SI-Einheit	Normbereich	Prozentuale Verteilung (%)
Erythrozyten	$10^{12}/l$	5,5 - 8,5	
Leukozyten	$10^9/l$	6,0 - 12,0	
Segmentkernige	$10^9/l$	3,0 - 9,0	
Stabkernige	$10^9/l$	0 - 0,5	
Eosinophile	$10^9/l$	0 - 1,2	
Lymphozyten	$10^9/l$	1,0 - 4,0	
Monozyten	$10^9/l$	0 - 0,6	
Thrombozyten	$10^9/l$	150 - 500	

Quelle: modifiziert nach Neiger (2009)

Bevor die Betrachtung des Ausstriches unter dem Lichtmikroskop (Multi-viewing Microscope, N-510) durchgeführt wurde, erfolgte nach Trocknung des Präparates eine Diff-Quick-Färbung.

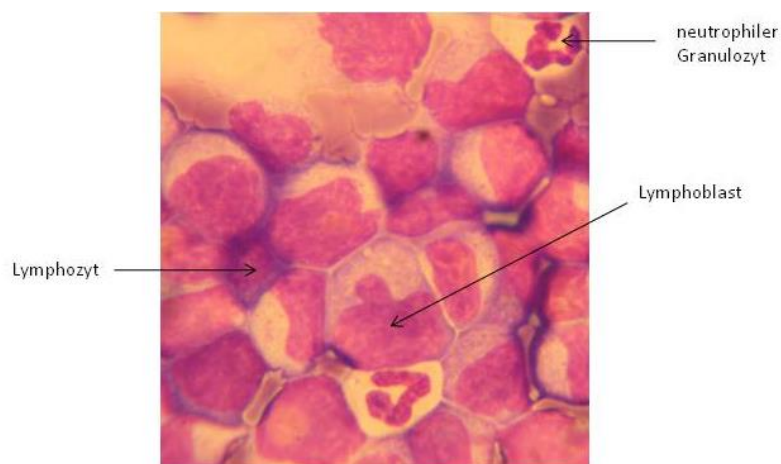


Abbildung 4: Blutausstrich

Die Abbildung wurde in der Tierklinik Hofheim durch Abfotografieren des Objektes im Multi-viewing Microscope, N-510 durchgeführt (Quelle: Tierklinik Hofheim; Dr. Martin Kessler).

4.2.3 Feinnadelaspiration und Tumoridentifizierung

Zur Durchführung der Feinnadelaspiration wurde eine geeignete Region am Tumor aufgesucht, um eine repräsentative Probe zu erhalten. Beim malignen Lymphom kann hierzu jeder periphere Lymphknoten mit Ausnahme der mandibularen Lymphknoten verwendet werden. Dies liegt daran, dass die mandibularen Lymphknoten mitunter aufgrund entzündlicher Prozesse in der Maulhöhle des Hundes das zytologische Bild verfälschen und somit die Diagnosestellung beeinträchtigen können. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass keine Probe aus einer hochgradig purulenten oder exsudativen Region genommen wird (Kessler, 2005). Mit Hilfe einer 21 - 23 G Nadel, einer 10 ml Spritze und der Aspirationspistole, „Zytogun“ (Scil) wurde aus mehreren Bereichen des Tumors ein Aspirat gewonnen. Mit einer sterilen 10 ml Spritze erfolgte das Aufsprühen der Probe auf einen Objektträger, welche mit einem Deckglas vorsichtig ohne Quetschen der Zellen ausgestrichen wurde. Anschließend erfolgte das Färben des Aspirates mittels Diff-Quick. Die Beurteilung der Probe wurde unter dem Lichtmikroskop (Multi-viewing Microscope, N-510) durchgeführt und anhand der vorhandenen Zellverbände eine Verdachtsdiagnose gestellt.

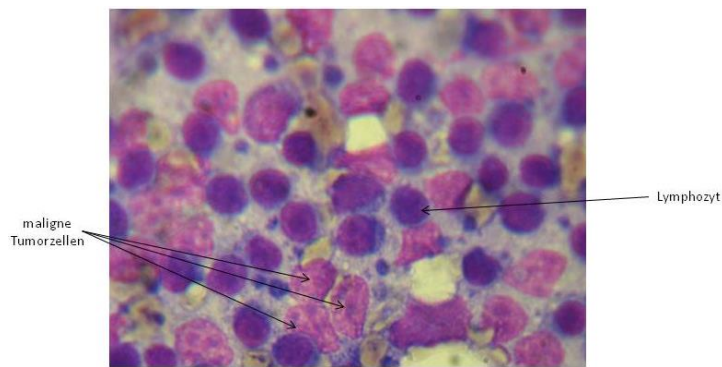


Abbildung 5: Zytologie eines malignen Lymphoms

In dieser Abbildung sind, wie für das maligne Lymphom typisch, maligne Tumorzellen (Lymphoblasten) deutlich zu erkennen. Die im Ausstrich vorhandenen neoplastischen Lymphozyten sind oftmals fragil und können bei der Aspiration oder beim Ausstreichen leicht zerreißen.

Die Abbildung wurde in der Tierklinik Hofheim durch Abfotografieren des Objektes im Multi-viewing Microscope, N-510, Ölimmersion durchgeführt (Quelle: Tierklinik Hofheim: Dr. Martin Kessler).

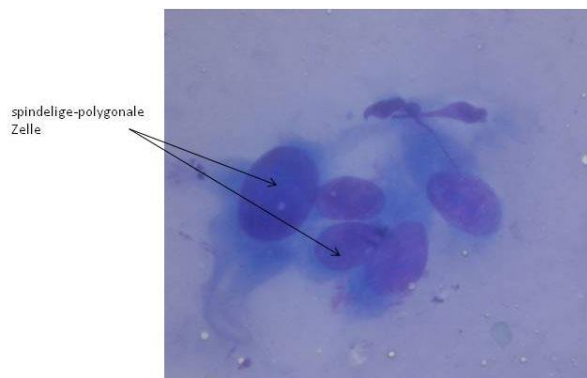


Abbildung 6: Zytologie eines Osteosarkoms

Die malignen Zellen des Osteosarkoms lassen sich anhand der spindelig bis polygonalen Zellen mit rund-ovalem Zellkern erkennen. Diese Zellform ist charakteristisch für einen mesenchymalen Ursprung.

Die Abbildung wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durch Abfotografieren des Objektes mit dem Leica DFC320 Digital Kamerasystem in der Ölimmersion durchgeführt.

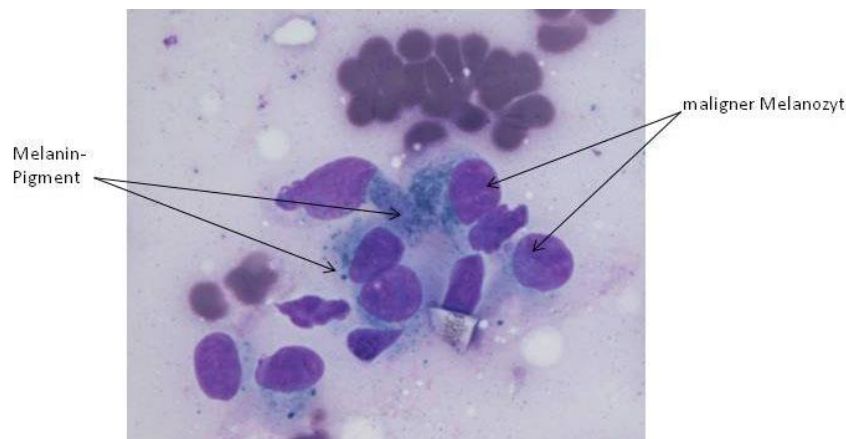


Abbildung 7: Zytologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom gehört zu den Rundzelltumoren. Die Zellen sind zumeist rund bis spindelförmig, gelegentlich auch epitheloid, und liegen einzeln. Charakteristisch für gut differenzierte Melanome, wie in dieser Abbildung gut erkennbar, sind die Melanin-Pigmente.

Die Abbildung wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durch Abfotografieren des Objektes mit dem Leica DFC320 Digital Kamerasystem in der Ölimmersion durchgeführt.



Abbildung 8: Zytologie des Hämangiosarkoms

Das Aspirat des Hämangiosarkoms ist zumeist blutreich und mit einer geringen Zellausbeute. Die malignen Zellen sind pleomorph mit basophilem Zytoplasma. Im Unterschied zum Hämangioperizytom sind die Zellen zumeist vakuolisiert.

Die Abbildung wurde in der Tierklinik Hofheim durch Abfotografieren des Objektes im Multi-viewing Microscope, N-510, Ölimmersion durchgeführt (Quelle: Tierklinik Hofheim: Dr. Martin Kessler).

4.2.4 Entnahme einer TruCut- oder Stanzbiopsie

Zur Biopsie wurde zunächst die entsprechende Region des Tumors mit einem Rasierer enthaart und die Hautstelle mit CutaSept desinfiziert. Anschließend wurde der Tumorbereich mit einem Lokalanästhetikum (Lidocainhydrochlorid 2 %) infiltriert. Nach einer Wartezeit von 15 min wurde für die TruCut Biopsie mit einem Skalpell ein kleiner Hautschnitt angelegt, welcher als Zugangspforte diente. Es wurden ca. drei bis fünf repräsentative Proben für di-

agnostische Zwecke entnommen. Teile dieser Proben wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1,8 ml *RNAlater* gegeben und für 12 Stunden bei Kühlschranktemperatur gelagert, bevor diese bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C untergebracht wurden. Zur Entnahme einer Stanzbiopsie ist keine Schnittein-zision mittels Skalpell notwendig. Das Biopat wurde auf die gleiche Art und Weise gelagert wie diejenige der TruCut Biopsie. Je nach Größe der jeweiligen Inzisionen wurde die Hautwunde mittels Hautfaden oder –klammern verschlossen. Es folgte eine Versorgung des Patienten mit einer Antibiose (Amoxicillin/Clavulansäure) und einem Schmerzmittel (NSAIDs).

4.3 METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND AUFARBEITUNG VON RNA

Die RNA aus Blutzellen und Geweben war Ausgangsmaterial verschiedener molekularbiologischer Experimente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl RNA aus Blutzellen als auch aus verschiedenen Tumorgeweben (Lymphknoten, Milz, Haut, Schleimhaut, Knochen) gewonnen. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und je nach Versuchsaufbau in die Touchdown-PCR oder quantitative *Real-Time* PCR eingesetzt. Über diese Methoden konnten die cDNA-Sequenzen zweier verschiedener Effluxtransporter (MDR1, MRP1) und einer Rezeptor-Tyrosinkinase (cKIT) sowie das Expressionsniveau von MDR1 unter Therapie untersucht werden.

4.3.1 Total-RNA Isolierung aus Blut

Die Methode hinsichtlich der RNA-Isolierung aus Blut wurde bereits im Rahmen einer anderen Doktorarbeit (Jasmin Kranz) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie etabliert. Die RNA-Isolierung aus Blut erfolgte mit Hilfe des RiboPure-Blood Kit's (Ambion). Das Probengemisch aus Blut und *RNAlater* im 2 ml Reaktionsgefäß wurde zunächst bei 13.200 rpm (s. Seite 32) für 1 min abzentrifugiert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde der *RNAlater* Überstand abpipettiert und 800 µl *Lysis Solution* und 50 µl *Sodium Acetate* hinzugefügt und per Vortexgerät vermischt. Dann wurden 500 µl *Acid-Phenol* zum Probengemisch gegeben und 30 s geschüttelt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit und einminütiger Zentrifugation (13.200 rpm) wurde die farblose obere wässrige Phase mittels Pipette abgezogen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 600 µl 100%iges Ethanol mit der Probe

vermischt. 700 µl des Probengemisches wurden in ein *Collection Tube* mit *Filter Cartridge* gegeben, bei 13.200 rpm für 5 bis 10 s zentrifugiert und anschließend wurde der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde je nach Probenmenge ca. dreimal wiederholt. Anschließend folgten drei Waschschrte mit *Wash Solution 1* und zweimal mit *Wash Solution 2*. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach Trocknung des *Filter Cartridge* durch einminütige Zentrifugation wurde dieser in ein neues 1,5 ml *Collection Tube* überführt. Dann wurden 50 µl einer auf 75°C erwärmten *Elution Solution* in die Mitte des *Filter Cartridge* pipettiert und anschließend wurde dieser Schritt nach einer Zentrifugation von 20 bis 30 s wiederholt. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte für 1 min bei 13.200 rpm. Die in dieser Methode gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3.2 Total-RNA Isolierung aus Gewebe

Die RNA-Isolierung aus Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit's (Qiagen, Hilden). Zunächst wurde das Leergewicht der zu verwendenden 2 ml Reaktionsgefäße mittels Einwaage durchgeführt. Nach Entnahme der Gewebeprobe mittels Pinzette aus der *RNA/later* Flüssigkeit konnten die Gewichte der Proben in den entsprechenden 2 ml Reaktionsgefäßen ermittelt werden. Lagen die Probengewichte unter 30 mg wurden 600 µl *Buffer RLT* mit *beta-ME* hinzupipettiert und mittels Stabhomogenisator im Ultra-Turrax homogenisiert. Das Lysat wurde im Anschluss 3 min bei 13.200 rpm bis zur Pelletbildung zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde zu gleichen Teilen des Supernatans 70-%iges Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren vermischt. 700 µl des Lysats wurden in einen *Spin Column* überführt, bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Je nach Lysatmenge wurde dieser Schritt mehrfach wiederholt. Dann folgten drei Waschschrte mit einmal 700 µl *Buffer RW1* und zweimal mit jeweils 500 µl *Buffer RPE*. Zwischen diesen Schritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 s und der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschrte wurde eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min durchgeführt und der Durchfluss verworfen. Der getrocknete *Spin Column* wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 30 bis 50 µl eines *RNAse freien Wassers* wurden auf den *Spin Colum* pipettiert und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnene RNA wurde zunächst photometrisch gemessen und, falls der RNA-Gehalt 30 µg überschritt, wurden nochmals 30 bis 50 µl *RNAse freies Wasser* hinzugegeben. Die RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

4.3.3 cDNA Synthese aus Total-RNA

Die cDNA-Synthese aus RNA wurde mit Hilfe der *SuperScript III Polymerase* des *First-Strand Synthesis Systems* für die RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurden maximal 8 µl RNA (zwischen 1 pg und 5 µg RNA) mit 1 µl *Random Hexamers* und 1 µl 10 mM dNTPs versetzt und für 5 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach einer Inkubation auf Eis für mindestens 1 min wurde ein Master-Mix bestehend aus 2 µl *10X RT Buffer*, 4 µl *25 mM MgCl₂*, 2 µl *0,1 M DTT*, 1 µl *RNase OUT* und 1 µl *SuperScriptTM III RT* pro Probe hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 25°C folgte eine Inkubation bei 50°C für 50 min. Die anschließende Terminationsreaktion erfolgte bei 85°C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

4.4.1 Allgemeines zur Primerauswahl

Die Auswahl der Primerpaare (s. 3.1.1) erfolgte mit Hilfe des Programmes Oligo 4.0. Soweit möglich wurden hierbei die unten stehenden Rahmenbedingungen eingehalten:

- Am 3'-Ende trugen die Primer ein TG, TC, AG oder AC.
- Der (G+C)-Gehalt der Primer lag zwischen 50 und 60 Prozent.
- Hinsichtlich der Vermeidung von Dimerbildungen waren vor allem die 3'-Enden der Primer weder untereinander noch mit sich selbst komplementär.
- Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen war ΔG für eine Loopbildung über 0.
- Die Ermittlung der Schmelztemperatur T_m erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,3 + 41 \times \frac{(\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C})}{\text{Primerlänge}} - \frac{650}{\text{Primerlänge}}$$

Ferner wurden alle Primer mit Hilfe des Online-Programmes *Primerblast* mit anderen Gensequenzen verglichen, um eine möglichst hohe Spezifität für das zu sequenzierende Gen zu erreichen. Die Synthese der Primer wurde sowohl von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) als auch von der Firma Metabion International AG (Martinsried) durchgeführt.

4.4.2 PCR-Reaktionsansatz

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit Hilfe des *FastStart High Fidelity PCR Systems* (Roche) durchgeführt, da für diese Experimente eine hohe Lesegenauigkeit erforderlich war. Die Reaktionsansätze für eine Probe setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz

Bezeichnung	Eingesetzte Menge (µl)
cDNA	2,0
Molekularbiologisches Wasser	37,5
DMSO	2,0
<i>FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10x</i>	5,0
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	1,0
Vorwärtsprimer	1,0
Rückwärtsprimer	1,0
<i>FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/µl)</i>	0,5

Bei größeren Versuchsansätzen wurde ein Master-Mix aus den oben genannten Reagenzien vorbereitet und zu jeder cDNA-Probe hinzugegeben. Die Proben wurden vermischt, zentrifugiert und anschließend im *Perkin-Elmer Gene Amp Cycler Typ 2400* (PerkinElmer) oder im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) inkubiert.

4.4.3 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR wurde zur Synthese des PCR-Produktes für eine anschließende Sequenzierungsreaktion angewendet. Bei hohen Anlagerungstemperaturen in den ersten Zyklen hat dieses PCR-Verfahren eine hohe Spezifität und bei niedrigeren Anlagerungstemperaturen im weiteren Zyklusverlauf wird eine hohe Ausbeute erzielt.

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 10 Zyklen
Primer-Anlagerung	$T_m - 2^\circ\text{C}$ (-0,5°C pro Z.)	30 sec	
Primer-Verlängerung	72°C	1 min/kb	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 36 Zyklen
Primer-Anlagerung	$T_m - 7^\circ\text{C}$	30 sec	
Primer-Verlängerung	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Anlagerungstemperatur der ersten zehn Zyklen wurde nahe des T_m -Wertes der Primer gewählt ($T_m - 2^\circ\text{C}$), wobei sich pro Zyklus die Temperatur um $0,5^\circ\text{C}$ reduzierte. Nach Vervollendung der ersten zehn Zyklen lag die Anlagerungstemperatur bei $T_m - 7^\circ\text{C}$, bei der die nachfolgenden 36 Zyklen fortgesetzt wurden.

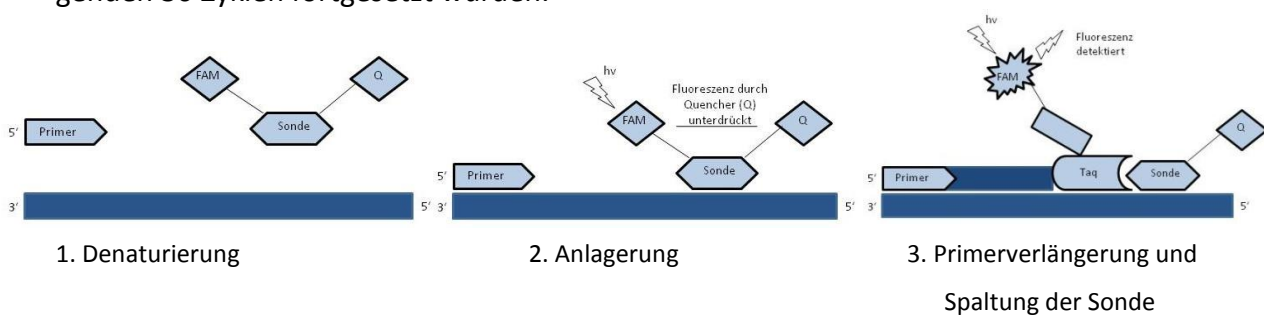


Abbildung 9: Prinzip der quantitativen *Real-Time PCR* mittels TaqMan System

In der Phase der Denaturierung kommt es zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges. Dann lagern sich Primer und Sonde an die Zielsequenz an und die Fluoreszenz des FAM Farbstoffes wird zunächst durch die Nähe zum Quencher (Q) unterdrückt. Während der Primerverlängerung gelangt die Taq-Polymerase an das 5'-Ende der angelagerten Sonde. Durch ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität wird die Sonde abgebaut und der FAM Farbstoff kann sich vom Quencher entfernen. Nach FAM Anregung kann das Fluoreszenzsignal schließlich detektiert werden.

(Quelle: eigene Darstellung modifiziert nach Dr. Barbara Döring)

4.4.4 Quantitative Real-Time PCR

Mit Hilfe einer quantitativen PCR im TaqMan 7300 wurde die Entwicklung des MDR1-Expressionsniveaus von Lymphompatienten im Verlaufe einer zytostatischen Chemotherapie verfolgt und das basale MDR1-Expressionsniveau von Patienten mit starken Nebenwirkungen (gastrointestinale Probleme, massive Knochenmarksuppression) ermittelt. Dabei wurde folgender Reaktionsmix in einer 96-well Platte verwendet:

<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	12,5 µl
Molekularbiologisches Wasser	6,25 µl
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i>	1,25 µl
cDNA	5 µl

Die eingesetzte cDNA wurde mit Hilfe der *SuperScript III* (Invitrogen; s. 4.4.2) nach erfolgreichem DNA-Verdau mittels DNase I (Fermentas; s. 4.1.2) synthetisiert. Als endogene Kontrollen dienten HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) und SDHA (Succinat-Dehydrogenase), von welchen ein stabiles Expressionsniveau angenommen wird. Die 96-well Platten wurden mit Folie verschlossen, zentrifugiert und die PCR-Reaktion nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95°C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 sec	
Primer-Anlagerung	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Bestimmung der Relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Der ΔC_T -Wert der MDR1-Expression wurde evaluiert, indem der „signal threshold cycle“ (C_T) der endogenen Kontrollen HPRT1 und SDHA von dem C_T -Wert des Efflux-Transportes MDR1 subtrahiert wurde. Nach dieser Normierung wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert durch Subtraktion des ΔC_T -Wertes einer Kontrolle vom ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Probe ermittelt. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und Kontrolle (Ratio), nach erfolgter Normalisierung auf das Referenzgen, ergibt sich erst durch Berechnung nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Formel.

4.5 SEQUENZIERUNG UND AUSWERTUNG DER SEQUENZSPUREN

Die Firma GATC (Düsseldorf) führte die Sequenzierung der PCR-Produkte durch. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden bis zu 10 ng PCR-Produkt mit molekularbiologischem Wasser auf 20 µl verdünnt. Weiterhin wurden für die Sequenzierungsreaktion in einem anderen 1,5 ml Reaktionsgefäß jeweils der Vorwärts- und Rückwärtsprimer getrennt voneinander für die Sequenzierung mitgeschickt. Die Sequenzierungsergebnisse waren auf der GATC Homepage über einen institutsinternen Zugang im FASTA-Format und als Chromatogramme abrufbar. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme *DNAstar*, *ClustalW* und *FinchTV*.

4.6 BEWERTUNG VON AMINOSÄURESUBSTITUTIONEN MIT DEN PROGRAMMEN POLYPHEN UND SIFT

Studien, die sich mit der Analyse von Polymorphismen in verschiedenen Genen beschäftigen, identifizieren unter anderem auch Aminosäuresubstitutionen in der Protein kodierenden Region. Jede Substitution hat das Potential die Proteinfunktion zu beeinflussen bzw. einen vollständigen Funktionsverlust hervorzurufen. Mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Bewertungsprogramme kann eine Voraussage über die funktionelle Auswirkung von Aminosäuresubstitutionen getroffen werden, sodass eine Priorisierung dieser für weitere Studienzwecke möglich ist. Zu den in dieser Studie verwendeten Programmen gehören PolyPhen und SIFT.

4.6.1 Bewertung nach PolyPhen

Das Programm PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) prognostiziert die Konsequenz einer Aminosäuresubstitution auf die Proteinfunktion. Dabei werden physikalische, phylogenetische und strukturelle Eigenschaften, die eine Aminosäure charakterisieren, berücksichtigt. PolyPhen führt ein Alignment verschiedener homologer Sequenzen einer Proteinfamilie durch und kalkuliert mit Hilfe einer PSIC-Software (Position-Specific Independent Counts) eine Profilmatrix. Dadurch kann anhand der Sequenzhomologie die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer bestimmten Aminosäure an einer bestimmten Position angegeben werden. Die Aminosäuresubstitutionen können dann anhand eines Scoring-Systems bewertet werden.

Tabelle 12: Bewertung von Aminosäuresubstitutionen nach PolyPhen

Die Begriffe wurden nicht ins Deutsche übersetzt, da diese so von der Datenbank angegeben wurden und demnach auch gleichnamig in dieser Arbeit verwendet wurden (L.-L. Wang et al. 2011).

Score	Konsequenz für die Proteinfunktion
0,000-0,999	Benign
1,000-1,249	Borderline
1,250-1,499	Potentially damaging
1,500-1,999	Possibly damaging
≥2,000	Damaging

4.6.2 Bewertung nach SIFT

Das Programm SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) verwendet die Sequenzhomologie und physikalische Eigenschaften der Aminosäuren, um eine Korrelation zwischen Aminosäuresubstitution und Proteinfunktion herzustellen. Dabei setzt das Programm voraus, dass für die Proteinfunktion wichtige Positionen in der Sequenz konserviert sind, während unwichtigere Substitutionen in Sequenzen einer Proteinfamilie divers vorhanden sein können. SIFT sucht für die Sequenzanalyse verwandte Proteine und liefert ein Alignment dieser. Anhand der Aminosäuren, die an verschiedenen Positionen im Alignment auftreten, kalkuliert das Programm mittels Frequenzen dieser die Wahrscheinlichkeit, ob eine Aminosäure an einer bestimmten Position toleriert wird oder nicht. Der Benutzer muss für die Analyse die jeweilige Proteinsequenz und die Aminosäuresubstitutionen angeben. Dabei kann für das Alignment zwischen verschiedenen Datenbanken gewählt werden: SWISS-PROT, SWISS-PROT/TrEMBL oder der NCBI PSI-BLAST. Letzterer wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt. Standardmäßig werden die Protein-Alignments mit einem medianen Konservierungswert von 3,0 erstellt. Höhere Werte liefern mehr falsch positive Ergebnisse, so dass für diese Untersuchung der von SIFT vorgegebene Standard von 3,0 verwendet wurde. Die Auswertung wird mit Hilfe eines Scoring-Systems durchgeführt (Ng und Henikoff, 2001; Ng und Henikoff, 2003).

Tabelle 13: Bewertung von Aminosäuresubstitutionen nach SIFT

Wie in Tabelle 12 wurden auch hier aus dem gleichen Grund die Begriffe in englischer Sprache belassen (L.-L. Wang et al. 2011).

Score	Konsequenz für die Proteinfunktion
0,201-1.00	Tolerant
0,101-0,20	Borderline
0,051-0,10	Potentially intolerant
0,00-0,05	Intolerant, affect protein function

5 Ergebnisse

5.1 ALLGEMEINE PATIENTENCHARAKTERISTIKA

5.1.1 Identifizierung von Polymorphismen in den MDR1- und MRP1-Genen sowie Evaluierung einer MDR1-vermittelten Therapieresistenz

Die in Tabelle 14 (Seite 52) aufgeführten Patienten wurden in bis zu 3 Teilstudien wie folgt untersucht:

- (1) In den ersten beiden Teilstudien I und II, die sich sowohl mit der Polymorphismenanalyse in den MDR1- und MRP1-Genen als auch mit der Ermittlung basaler MDR1-Expressionslevel beschäftigten, wurden ausschließlich canine Lymphompatienten aufgenommen.
- (2) In der dritten Teilstudie III wurden ebenfalls canine Lymphompatienten herangezogen. Diese wurden nach Möglichkeit durch alle vier Therapiezyklen über einen Zeitraum von ca. fünf Monaten begleitet, um eine Therapieresistenz durch Hochregulation von MDR1 zu untersuchen. In Einzelfällen war ein Begleiten der Hunde bis zum Ende der zytostatischen Chemotherapie aufgrund von Therapieresistenzen und/oder Nebenwirkungen, die ein Fortsetzen der Therapie seitens der Besitzer verhinderten, nicht möglich.

Insgesamt wurden 27 Hunde, die an verschiedenen anatomischen Formen eines Lymphoms erkrankt waren, im Alter von 4 bis 16 Jahren untersucht. Das Durchschnittsalter betrug neun Jahre. Die Hunde gehörten 15 verschiedenen Hunderassen an. Am häufigsten waren Mischlinge (n=8), Retriever (n=4) und Rhodesian Ridgebacks (n=3) vertreten. 16 Patienten waren männlich (sieben intakt, neun kastriert) und elf weiblich (fünf intakt, sechs kastriert).

Tabelle 14: Allgemeine Patientencharakteristika und Studienzuordnung (MDR1 und MRP1 Studie)

^a Das Geschlecht der Hunde wird als M= männlich, Mk= männlich kastriert, W= weiblich und Wk= weiblich kastriert angegeben. ^b Die Diagnose wird als erstes genannt, gefolgt vom Tumorstadium (I-V), dem Immunphänotyp (B-/T-Zell) und dem Substadium (a= gutes Allgemeinbefinden, b= schlechtes Allgemeinbefinden) sofern diese Angaben verfügbar waren; ML = multizentrisches Lymphom. ^c Teilstudie I, Bestimmung der basalen MDR1 Expressionslevel; Teilstudie II, Sequenzierung der full-length MDR1 Transkripte; Teilstudie III, longitudinale Analyse der MDR1 Expression während der Chemotherapie. ^d Basale MDR1 Expressionslevel werden als ΔC_T Werte angegeben (C_T MDR1 - C_T HPRT1). ^e Die individuelle Verträglichkeit der Chemotherapie wurde in die drei Kategorien, toleriert (T), milde Nebenwirkungen (mNW) und schwere Nebenwirkungen (sNW), eingeteilt.

Hund	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht ^a	Gewicht (kg)	Diagnose ^b	Teilstudie ^c			basale MDR1 Expressions- level ^d	Verträglichkeit der Chemotherapie ^e
						I	II	III		
1	Mischling	8	Mk	37	ML, V, b	X	X		6.87	mNW
2	Afghane	6	M	31	ML, b	X	X		5.91	T
3	Golden Retriever	6	M	34	ML, V, a	X	X		7.97	sNW
4	Jack Russel Terrier	16	Mk	7	ML, V, B-Zell, a	X	X		8.19	sNW
5	Briard	7	Mk	31	ML, B-Zell, a	X	X		4.86	T
6	Labrador Retriever	12	W	29	ML, V, B-Zell, a	X	X		5.54	T
7	Flat Coated Retriever	8	Mk	29	ML, V, a	X	X	X	7.07	mNW
8	Mischling	12	Wk	21	ML, V, b	X	X	X	6.60	mNW
9	Beagle	9	M	12	Kleinzelliges Lymphom, B-Zell, a	X	X	X	4.67	T
10	Mischling	4	Mk	33	ML, V, a	X	X	X	5.87	mNW
11	Border Collie	13	Wk	21	ML, V, a	X	X	X	6.24	mNW
12	Mischling	14	Wk	14	ML, V, a	X	X		5.50	T
13	Mischling	9	Mk	39	ML, III, a	X	X		8.97	sNW
14	Deutscher Schäferhund	9	W	35	ML, V, B-Zell, a	X	X		5.67	mNW
15	Mischling	12	M	33	ML, a	X	X		4.66	T
16	Rhodesian Ridgeback	6	W	42	ML, V, B-Zell, a	X	X		5.23	T
17	Border Collie	9	M	22	ML, IV, a	X	X		8.55	sNW
18	Malinois	11	Mk	32	ML, V, a	X	X	X	5.32	mNW

19	Labrador Re- triever	10	Wk	35	ML, V, B-Zell, a	X	X	5.45	T
20	Shi Tzu	14	M	4	ML, V, a	X	X	4.46	T
21	Mischling	13	Wk	37	ML, V, a	X	X	6.15	sNW
22	Rhodesian Ridgeback	7	M	43	ML, V, T-Zell, b	X	X	7.89	T
23	Königspudel	11	Mk	30	Kleinzelliges Lymphom, B-Zell, a	X	X	5.90	T
24	Mischling	12	Wk	12	ML, V, a	X	X	5.68	T
25	Pon	12	W	19	Mycosis fungoides, T-Zell	X	X	5.55	T
26	Rhodesian Ridgeback	9	W	38	ML, V, a	X	X	4.07	T
27	West Highland Terrier	12	Mk	9	ML, V, B-Zell, b	X	X	6.86	T

Tabelle 15 stellt im Einzelnen für diese Studie dar, welche anatomischen Formen, klinische Stadien und Substadien sowie welcher Immunphänotyp bei den einzelnen Patienten ermittelt wurden. Bei der Mehrheit der Hunde mit multizentrischem Lymphom (n=24) lag bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium (V, n=19) vor. Bei einem Hund wurde das klinische Stadium III und bei einem anderen das Stadium IV ermittelt. Bei den restlichen drei Hunden wurde auf ein weiteres Staging seitens der Besitzer verzichtet. Die Beurteilung des klinischen Substadiums ergab bei 22 Patienten ein malignes Lymphom des Substadiums a und bei fünf Patienten das Substadium b. Bei allen Hunden mit mediastinalem Lymphom und Mycosis fungoides lag ein T-Zell-Lymphom (n=2) vor, während bei der Mehrheit der multizentrischen und kleinzelligen Lymphome ein B-Zell-Lymphom (n=9) diagnostiziert wurde. Bei 16 Patienten erfolgte keine Immunphänotypisierung, da auf eine Knochenmarkuntersuchung seitens der Besitzer verzichtet wurde.

Tabelle 15: Übersicht über den klinischen Status der untersuchten Patienten

In Ergänzung zu Tabelle 14 (Seite 52) erfolgt hier die Einteilung der Patienten nach anatomischer/histologischer Erkrankungsform, klinischem Stadium und Substadium sowie Glukokortikoidvorbehandlung. Das klinische Stadium und der Immunphänotyp liegen nicht für jeden Patienten vor, da aufgrund der gleichen Therapie für alle Stadien bzw. Immunphänotypen seitens der Besitzer darauf verzichtet wurde.

Faktor	Anzahl
anatomisch/histologische Form	
multizentrisch	24
mediastinal	1
Mycosis fungoides	1
kleinzelliges	1
klinisches Stadium (multizentrisches Lymphom)	
III	1
IV	1
V	19
unbekannt	6
klinisches Substadium	
a	22
b	5
Immunphänotyp	
B-Zell-Lymphom	9
T-Zell-Lymphom	2
unbekannt	16

Alle Patienten erhielten das gleiche Chemotherapieprotokoll (siehe Tabelle 9, Seite 37).

5.1.2 Identifizierung von Polymorphismen und „Gain-of-function“ Mutationen im cKIT Gen

Diese Studie beschäftigte sich mit der Suche nach neuen Polymorphismen und in der Literatur beschriebenen „Gain-of-function“ Mutationen im caninen cKIT-Gen. Hierzu wurden von 17 Hunden Gewebeproben verschiedenster Tumore entnommen. Die Hunde waren bei Diagnosestellung zwischen vier und 12 Jahren alt und hatten somit ein Durchschnittsalter von acht Jahren. Die Patienten gehörten 12 verschiedenen Rassen an, wobei am häufigsten Mischlinge (n=5) und Briards (n=2) vertreten waren. 14 Patienten waren männlich (acht intakt, sechs kastriert) und vier weiblich (zwei intakt, zwei kastriert). Bei vier Patienten wurde mittels TruCut-Biopsie ein malignes Lymphom diagnostiziert. Bei einem dieser handelte es sich um ein gastrointestinales Lymphom, bei dem die Biopsie in der OP erfolgte. Die Diagnosen Osteosarkom (n=4), Melanom (n=2), Hämangiosarkom (n=3), maligner Rundzelltumor (n=1), Spindelzellsarkom (n=1), granulomatöse Splenitis (n=1) und Fibrosarkom (n=1) wurden ebenfalls durch eine histologische Untersuchung nach Stanzbiopsie oder Resektion eines Organs/Körperteils (Milz/Gliedmaßen) gestellt.

Tabelle 16: Allgemeine Patientencharakteristika (cKIT-Studie)

Von allen Patienten in dieser Tabelle wurden innerhalb von 15 Monaten Gewebeproben mittels TruCut- oder Stanzbiopsie gewonnen. Bei den Patienten 1 bis 10 war eine erfolgreiche Sequenzanalyse für cKIT durchführbar, während dies bei den nach unten abgetrennten sieben Hunden mit verschiedenen Primerkombinationen nicht möglich war. Das Alter wurde jeweils in Jahren und das Gewicht in kg angegeben.

1a=Blutprobe; 1b=Gewebeprobe; m=männlich; mk=männlich kastriert; w=weiblich; wk=weiblich kastriert; ML=malignes Lymphom, multizentrisch; MLg=malignes Lymphom, gastrointestinal; O=Osteosarkom; M=Melanom; H=Hämangiosarkom; MR=maligner Rundzelltumor; S=Spindelzellsarkom; gS=granulomatöse Splenitis; F=Fibrosarkom.

Hund	Rasse	Alter	Geschlecht	Gewicht	Diagnose	Lokalisation	Klinik
1a	Königspudel	11	mk	30	ML	multizentrisch	/
1b	Königspudel	11	mk	30	ML	multizentrisch	/
2	Leonberger	7	w	48	O	Karpus links	Lahmheit
3	Flat Coated Retriever	10	m	32	M	Zunge	Inappetenz
4	Briard	7	m	31	ML	multizentrisch	/
5	Mischling	11	mk	26	O	2./3. Zehe rechts vorne	Lahmheit
6	Welsh Terrier	7	w	10	M	Nase	/
7	Amerikanisch Kanadischer Schäferhund	7	mk	38	O	Tibia rechts distal	Lahmheit
8	Teckel	12	wk	6	H	Milz	Anämie, Apathie
9	Mischling	9	m	35	ML	multizentrisch	/
10	Mischling	11	m	28	H	Milz	Apathie

11	Border Terrier	6	m	6	MR	intraskapulär	Dolenz Wirbelsäule
12	Briard	9	mk	35	MLg	Darm	Diarrhoe
13	Mischling	6	m	29	H	Leber	Vomitus
14	Rhodesian Ridgeback	9	m	45	O	Femur links distal	Lahmheit
15	Deutscher Schäferhund	4	mk	38	S	Unterkiefer rechts	Foetore ex ore
16	Mischling	4	wk	24	gS	Milz	/
17	Golden Retriever	8	m	31	F	proximal linkes Auge	/

5.2 SEQUENZANALYSE MDR1

5.2.1 MDR1 Primer und ihre Lokalisation

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer (MDR1-F1 bis F4 und R1 bis R4) zur Amplifikation des kompletten MDR1-Transkriptes in vier Teilabschnitten wurden bereits 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durch Dr. Barbara Döring etabliert und 2007 durch Frau Jasmin Kranz ergänzt. Hier wurden diese Primer genutzt, um das komplette MDR1-Transkript aus Vollblut von Patienten zu amplifizieren und in einer nachfolgenden PCR zu sequenzieren. Abbildung 10 (Seite 57) zeigt die Lokalisation der vier amplifizierten Bereiche im Membrantopologiemodell des MDR1-Proteins und Abbildung 11 (Seite 57) zeigt die vier PCR-Amplifikate repräsentativ von einem Patienten nach Auftrennung im Agarosegel.

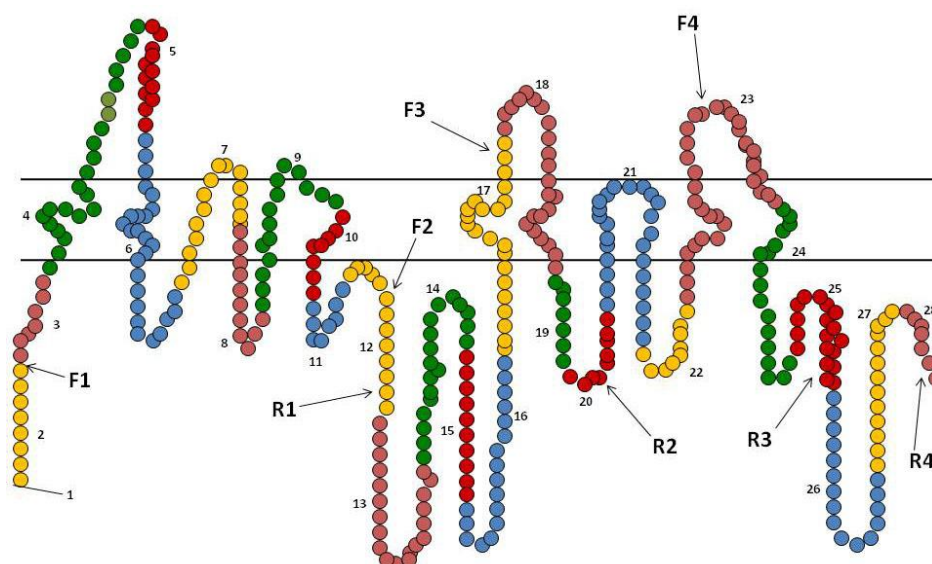
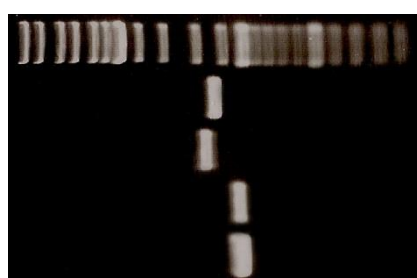


Abbildung 10: Lokalisation der verwendeten Primer im Membrantopologiemodell des MDR1-Proteins

Das MDR1-Protein besteht aus zwei transmembranären Domänen mit jeweils sechs alpha-helikalen Transmembrandomänen, welche die Plasmamembran (schematisch symbolisiert durch die beiden Striche) durchdringen. Extrazelluläre Proteinloops sind oben und interzelluläre Loops unten dargestellt. Des Weiteren sind die proteincodierenden Exone 1-28 des MDR1-Gens in der Proteinsequenz farblich markiert. Die Lokalisation der verwendeten Primer ist angegeben und repräsentiert die Proteindomäne, die auf dem kodierenden MDR1-Transkript von der PCR-Reaktion mit den entsprechenden Primern erfasst wird.



Längenstandard

Fragment 1: 1200 bp, Primer F1-R1

Fragment 2: 1450 bp, Primer F2-R2

Fragment 3: 1000 bp, Primer F3-R3

Fragment 4: 1000 bp, Primer F4-R4

Abbildung 11: Visualisierung der vier MDR1-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten MDR1-Transkripts

5.2.2 Polymorphismen im caninen MDR1-Gen

Aus dem Sequenzvergleich aller bisher in GenBank/EBI/DDBJ veröffentlichten MDR1 cDNA Sequenzen resultiert bereits eine Liste möglicher SNPs im MDR1-Gen (Tabelle 17, Seite 58, erweitert nach Geyer und Janko, 2012). Das Alignment wurde mit den Sequenzen mit den GenBank Accession Nos. AB066299.1, AF045016.1, AF092810.1, AF403240.1, AF536758.1, AJ419568.1, AY582533.1, DQ068953.1 und FJ617477.1 erstellt. Alle ermittelten SNPs wurden mit Hilfe der Programme PolyPhen und SIFT bewertet. Aufgelistet werden sämtliche silent SNPs und solche mit Aminosäuresubstitution sowie das jeweils betroffene Exon und Proteinmotiv, in welchem der Polymorphismus lokalisiert ist.

Tabelle 17: Polymorphismen-Bewertung bekannter caniner MDR1-Polymorphismen

Aminosäurekürzel=Einbuchstabencode siehe Seite XI; EL=Extrazellulärer Loop; IL=Intrazellulärer Loop;
TMD=Transmembrandomäne; ATP-bs=ATP-binding site

SNP	GenBank Accession Nr.	Aminosäure- austausch	Exon	Motif	PolyPhen- Bewertung/ Score	SIFT- Bewertung/Score
A23G	AJ419568	silent	2			
A51G	AJ419568	silent	2			
A86G	AJ419568	silent	3			
230(del4)	AJ419568	vorzeitiges STOP-Codon	4	1. EL		
A265G	AF536758 FJ617477	T89A	4	1. EL	benign; 0,988	tolerated; 0,76
T564C	AJ419568	silent	7		-	-
A574G	AF045016	silent	7		-	-
A591C	AF536758	silent	7		-	-
G635C	AF045016	silent	7		-	-
A862G	AF536758	R288G	9	2. IL	benign; 1,347	tolerated; 0,16
T985A	AF045016	S329T	9	3. EL/TMD6	benign; 0,208	tolerated; 1,00
A996G	AF045016	silent	9		-	-
T1232C	AJ419568	silent	12		-	-
A1595G	AB066299 AF045016	Q532R	14	ABC Signa- ture Motif	probably damaging; 2,575	affect protein function; 0,02
G1863A	AF092810	silent	15		-	-
G1914C	AF092810	E638D	16		benign; 0,165	tolerated; 0,70
A2082T	AF045016	Silent	17		-	-
C2086T	AB066299 AF045016	P696S	17		benign; 0,604	tolerated; 0,42
A2181G	AF092810	Silent	17			
A2258T	AF092810	N753I	18	4. EL	benign; 1,102	affect protein function; 0,04
C2322T	AF092810	silent	18			
C2328T	AF092810	silent	19			
G2349A	AF092810	silent	19			
C2426T	AF092810	P809L	20	3. IL	possibly da- maging; 1,70	tolerated; 0,20
A2451C	AF092810	silent	20			
G2471T	AF092810	silent	20			
A2601G	AY582533	silent	21		-	-
G2741A	AF092810	R914Q	22	4. IL	benign ; 0,831	tolerated ; 0,19
A2781G	AF092810	silent	22			
T2758C	AF092810	silent	22			
G2907A	AJ419568	silent	23			
A3442G	AY582533	M1148V	26	ATP-bs	benign ; 0,322	tolerated ; 0,77
T3792C	AF536758	silent	28			
G3817A	AF045016	silent	28			
G3840A	AJ419568	silent	28			

Um eine Korrelation zwischen Therapie-assoziierten Nebenwirkungen und SNPs, die einen eventuellen Funktionsverlust des MDR1 Proteins verursachen, herstellen zu können, wurden wie in Abb. 11 gezeigt PCR-Amplifikationen mit anschließender DNA-Sequenzierung der full-length MDR1 Transkripte von 18 Hunden durchgeführt. Dabei standen Nebenwirkungen in Form einer Knochenmarksuppression (Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie) und/oder gastrointestinaler Symptome (Vomitus, Diarrhoe) nach Applikation verschiedenster Zytostatika (Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Lomustin) im Vordergrund. Jede einzelne Sequenz wurde mit einer MDR1 Referenzsequenz, die in der Datenbank GenBank eingetragen ist, verglichen [GenBank: NM_001003215]. Alle identifizierten Polymorphismen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Wie bereits zuvor publiziert, wurden auch in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der PolyPhen und SIFT Algorithmen die detektierten SNPs hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Proteinfunktion bewertet (Wang et al., 2011). Insgesamt konnten 18 Polymorphismen identifiziert werden; unter diesen befanden sich 17 SNPs und eine Triplet-Insertionsmutation.

.

Tabelle 18: MDR1-Polymorphismen bei den 18 Patienten aus Teilstudie II

^a Nukleotid- und Aminosäurepositionen sind nach den Referenzsequenzen NM_001003215 (Nukleotide) und NP_001003215 (Protein) bezeichnet. ^b Sequenzmotive des MDR1 P-Glycoproteins wurden wie folgt abgekürzt: TMD = Transmembran-Domäne, ABC = ATP binding cassette, ABC-SM = ABC Signaturmotiv, ATP-BS = ATP binding site. ^c Hunde, die die Chemotherapie gut tolerierten. ^d Hunde, welche Nebenwirkungen unter der Chemotherapie zeigten. Homozygotes (hom) oder heterozygotes (het) Auftreten der Polymorphismen.

SNP ^a	Aminosäuren- austausch ^a	Exon	Motiv ^b	PolyPhen Bewer- tung	SIFT Bewertung	Fälle	
						T ^c	NW ^d
nt141 ins AAT	24 ins N	3	N-terminus			n=8 (hom)	n=4 (hom)
T338A	F90Y	4	TMD I	Benign	Tolerated	n=1 (hom)	
G399A	Silent	5				n=1 (het)	
G643A	V192I	7	TMD III	Benign	Tolerated	n=9 (hom)	n=8 (hom)
C704G	P212R	7	TMD IV	Probably damaging	Tolerated	n=9 (hom)	n=8 (hom)
A1054T	T329S	9	ABC	Benign	Tolerated	n=9 (hom)	n=7 (hom)
G1065A	Silent	9				n=10 (hom)	n=7 (hom)
G1664A	R532Q	14	ABC-SM	Probably damaging	beeinträchtigt die Proteinfunktion	n=10 (hom)	n=8 (hom)
G1932T	K621N	15	ATP-BS	Benign	Tolerated		n=1 (het)
T2151A	Silent	17				n=9 (hom)	n=7 (hom)
T2155C	S696P	17	ATP-BS	Benign	Tolerated	n=9 (hom)	n=7 (hom)
A2190G	Silent	17				n=1 (het)	
C2889T	Silent	23				n=1 (het)	
C2895T	Silent	23				n=1 (hom)	
A3511G	M1147V	26	ATP-BS	Benign	Tolerated	n=1 (hom), n=1 (het)	n=1 (hom)
C3639T	Silent	27				n=1 (het)	
A3886G	I1273V	28	ATP-BS	Benign	Tolerated	n=7 (hom)	n=2 (hom)
G3909A	Silent	28				n=1 (hom)	

Ein Aminosäureaustausch kann die Struktur eines Proteins verändern und somit zu einer Funktionsänderung bzw. einem vollständigen Funktionsverlust führen. Es ist aber auch möglich, dass die Funktion des Proteins durch den Aminosäureaustausch völlig unbeeinträchtigt ist. In der nachfolgenden Abbildung wurden alle Aminosäuresubstitutionen in dem Topologiemodell des MDR1-Transporters dargestellt.

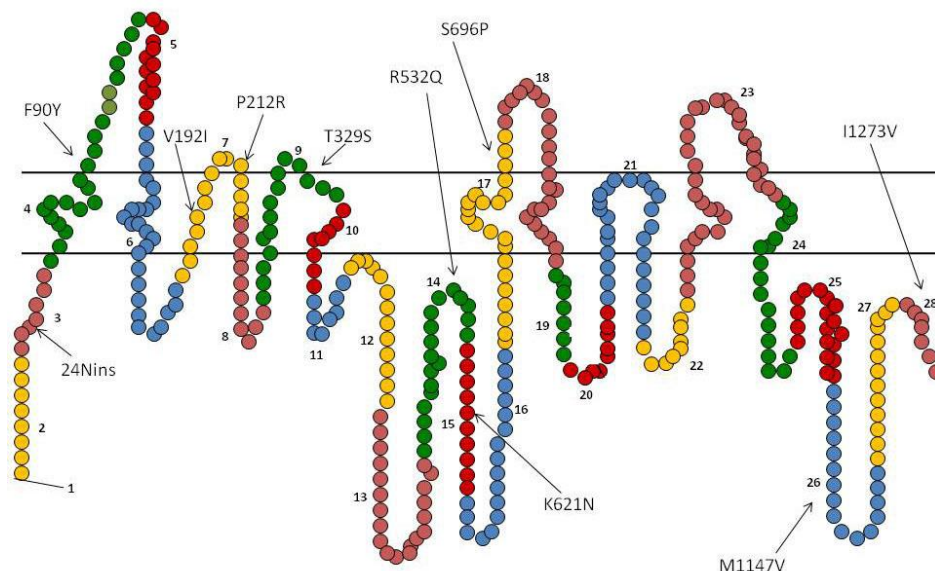


Abbildung 12: Lokalisationen der identifizierten nicht-synonymen Polymorphismen im MDR1-Transporter
Dargestellt ist die Membrantopologie des humanen MDR1-Transporters.

Acht dieser 17 Polymorphismen waren „silent“ und veränderten somit nicht die Proteinsequenz. Die restlichen neun SNPs konnten als „non-synonymous“ identifiziert werden und resultierten in einem Aminosäureaustausch: F90Y, V192I, P212R, T329S, R532Q, K621N, S696P, M1147V und I1273V. Die Polymorphismen an den Aminosäurepositionen 329, 532, 696 und 1147 sind bereits publiziert (Geyer und Janko, 2012). Die Mehrzahl der SNPs wurde als „benign“ und „tolerated“ durch Polyphen und SIFT bewertet. Die beiden SNPs P212R und R532Q hatten laut beider Bewertungsprogramme einen potentiellen Effekt auf die Effluxfunktion von P-Glycoprotein. Bei einem vollständigen Funktionsverlust des MDR1-Transporters ist davon auszugehen, dass Zytostatika (Vincristin, Doxorubicin) in den therapeutisch üblichen Dosierungen nicht gut verträglich sind, wie dies bereits für Hunde mit homozygoter nt230(del4) MDR1-Mutation bekannt ist.

Die Triplet-Insertionsmutation (24insN) konnte bei der Mehrheit der Hunde (n=12) ermittelt werden. Dabei wird an Position 141 des offenen Leserahmens ein „AAT“ eingebaut, welches in der Proteinsequenz zu der Insertion der Aminosäure Asparagin an Position 24 führt.

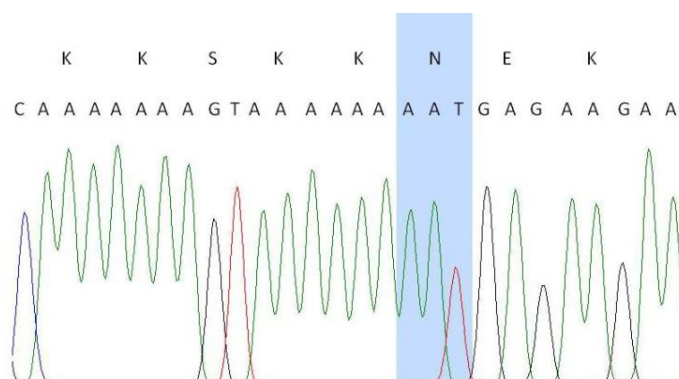


Abbildung 13: Chromatogramm eines Hundes mit einer "AAT" Insertion

Die „AAT“ Insertion (blau) ist an Position 141 des offenen Leserahmens des MDR1-Transkriptes zu finden.

Jedoch dominiert keine der genannten Aminosäuresubstitutionen in den Hunden, welche deutliche Nebenwirkungen entwickelten, verglichen mit denjenigen, welche die Chemotherapie sehr gut vertragen haben. Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass diese Polymorphismen keine signifikante und klinisch relevante Beeinträchtigung der MDR1-Effluxfunktion nach sich ziehen.

5.3 MDR1-EXPRESSIONSNIVEAU BEI HUNDEN MIT NEBENWIRKUNGEN

In Teilstudie I sollte das basale MDR1-Expressionsniveau von Lymphom-Patienten bestimmt werden. Auf diese Weise sollte die Ursachensuche bezüglich der Nebenwirkungsentwicklung über die Polymorphismenanalyse hinaus auch auf RNA-Ebene ausgeweitet werden.

Die basalen MDR1-Expressionslevel waren hochgradig unterschiedlich und variierten von 1-fach bis 30-fach. Dabei repräsentierte der Wert „1“ denjenigen Patienten mit dem absolut niedrigsten MDR1-Expressionsniveau.

Die Verträglichkeit der Chemotherapie wurde anhand der Routineblutbilder und Befragungen der Patientenbesitzer mit Hilfe einer Grading-Skala (siehe Tabelle 8, Seite 28) evaluiert. Auf Grundlage dieser konnte für jeden Hund ein „Score“ errechnet werden, der die Summe aller Grading-Werte aus den einzelnen Kategorien über acht bis neun Fragerunden darstell-

te. Mit Hilfe dieser „Scores“ konnten in Bezug auf die Therapieverträglichkeit drei Kategorien definiert werden: toleriert (T) mit einem „Score“ von 0 bis 5; milde Nebenwirkungen (mNW) mit Werten zwischen fünf und 20; und schwere Nebenwirkungen (sNW) mit einem „Score“ über 20. Abbildung 14 zeigt die Korrelation zwischen basalem MDR1-Expressionslevel und der Verträglichkeit der Chemotherapie. Aufgrund der in den genannten Kategorien gegebenen Vergleichbarkeit der Expressionsdaten für beide verwendeten Kontrollgene (HPRT1 und SDHA), sind für diese Graphik lediglich die Daten für HPRT1 gezeigt.

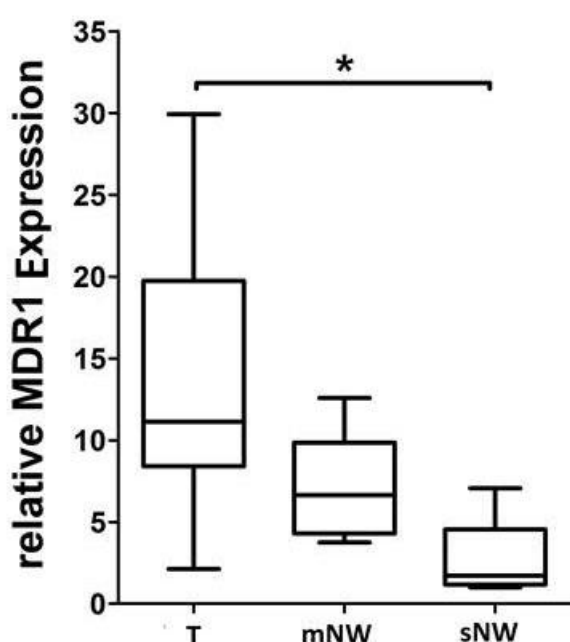


Abbildung 14: Basales MDR1-Expressionsniveau vor Beginn der zytostatischen Therapie

Die Abbildung zeigt das basale MDR1 Expressionsniveau aus Blutproben von 27 Hunden mit unterschiedlichen Formen des malignen Lymphoms vor Beginn der Chemotherapie. Die relative Expression, welche auf der y-Achse dargestellt ist, wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode errechnet. Diese repräsentiert die x-fach höhere MDR1 Expression im Vergleich zu Hunden mit dem absolut niedrigsten MDR1 Expressionslevel (=Kalibrator). Die Expressionsdaten werden in drei Kategorien dargestellt: (1) diejenigen Hunde, welche die Therapie gut tolerierten (T), (2) Patienten, mit milden Nebenwirkungen (mNW) oder (3) Patienten, die schwerwiegende Nebenwirkungen zeigten (sNW). Die vorliegenden Daten sind sowohl als Median mit min/max als auch als 25%/75% Perzentile präsentiert. *Statistisch signifikant bei $p < 0,01$

Mit einem Mittelwert \pm SD der MDR1-Expressionslevel von $13,4 \pm 7,3$ haben insgesamt 15 Hunde die Therapie sehr gut vertragen, ohne signifikante Nebenwirkungen zu entwickeln. Patienten (n=7) aus der zweiten Kategorie (mNW) entwickelten Nebenwirkungen von niedrigen Toxizitätsgraden oder zeigten einmalig schwerere Unverträglichkeiten. Diese hatten einen MDR1-Expressionslevel von $7,3 \pm 3,2$. Schließlich zeigten Hunde (n=5) aus der dritten Kategorie (sNW) immer wiederkehrende schwere Nebenwirkungen, die in manchen Fällen

eine stationäre Aufnahme nötig machten. Diese Patienten zeigten einen MDR1-Expressionslevel von $2,6 \pm 2,5$. Dieser Wert der Kategorie sNW war verglichen mit der Kategorie T signifikant niedriger.

Nachfolgend sind die Nebenwirkungen aller fünf Hunde aus Kategorie drei beschrieben: Zwei Hunde zeigten einen rezidivierenden Vomit und eine Diarrhoe nach Vincristingabe. Eine Dosisreduktion hatte keinen Effekt auf die gastrointestinale Problematik. Die Symptomatik hatte zudem einen massiven Gewichtsverlust zur Folge. Ein weiterer Hund zeigte nach Vincristin immer wieder eine Neutropenie der Grade 2 und 3. Im letzten Therapiezyklus entwickelte der Patient zudem neurologische Ausfallerscheinungen in Form einer Ataxie, welche für Einzelfälle als Vincristin-Nebenwirkung beschrieben wurden (Krugman et al., 2012). Ein Hund musste nach einer Doxorubicingabe stationär aufgenommen werden. Der Patient zeigte eine Diarrhoe Grad 4, welche trotz symptomatischer Therapie nicht zu beheben war. Der letzte Patient, ein Border Collie, entwickelte nach Vincristin-Applikation neben einer Diarrhoe Grad 4 auch einen Vomit Grad 3 sowie eine Neutropenie Grad 4. Da der Patient febril in die Tierklinik Hofheim eingeliefert und daraufhin stationär aufgenommen wurde, musste hier zusätzlich eine Antibiose verabreicht werden. Die Chemotherapie wurde daraufhin noch im ersten Zyklus abgebrochen. Es ist bereits in der Literatur eine Überempfindlichkeit gegenüber Zytostatika wie Vincristin bei Border Collies, die nicht von der MDR1 nt230(del4)-Mutation betroffen waren, beschrieben (Mealey et al., 2008).

5.4 THERAPIERESISTENZ DURCH MDR1 BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN

Wie bereits einleitend erörtert stellt die Therapieresistenz im Verlauf einer zytostatischen Chemotherapie die Hauptursache für den Misserfolg der Behandlung dar. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die durch MDR1 vermittelte Resistenz erfasst. Durch die Analyse aus Blutproben ermöglichte dies eine minimal invasive Methode für den Hund, die Entwicklung einer möglichen Resistenz zu verfolgen. Bislang erfolgten derartige Untersuchungen mit Hilfe von Gewebeproben.

5.4.1 Sensitivität der verwendeten Assays

Für die Analyse der MDR1-Expression in Blutzellen wurden Standardassays von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Hierunter waren ein für MDR1 (ABCB1) spezifischer Assay (Cf02693309_m1) und zwei Assays für konstitutiv exprimierte Kontrollgene (Housekeeper-Gene), HPRT1 (Cf02626256_m1), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, und SDHA (Cf02664982_m1), Succinat-Dehydrogenase.

Um eine Quantifizierung der Expressionsdaten zu erlauben, wurden für alle drei Assays zunächst Eichkurven ermittelt und aus diesen die Effizienz der Amplifikation berechnet. Hierfür wurden aus der aus Vollblut gewonnenen cDNA die in Tabelle 19 (Seite 66) gezeigten Verdünnungen erstellt und mit den Assays MDR1, HPRT1 und SDHA in der real-time PCR quantifiziert. Die erhaltenen C_T Werte sind ebenfalls in der Tabelle angegeben und dienten zur Berechnung der Amplifikationseffizienz in dem angegebenen C_T -Bereich. Aus dem Slope der Eichkurven konnte die Effizienz der Quantifizierungsassays berechnet werden. Dabei entspricht eine Effizienz von 100 % einer exakten Verdopplung der Kopienzahl pro Amplifikationszyklus.

Tabelle 19: Erstellung von Eichgeraden für die verwendeten Quantifizierungsassays zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Gen	Verdünnung je PCR-Reaktion	MW der C _T -Wert	Slope
MDR1	0	kein C _T	3,94
	1:1	31,65	
	1:2	32,16	
	1:4	33,67	
	1:6	35,15	
	1:8	35,29	
	1:10	35,88	
	1:100	39,28	
	1:1000	kein C _T	
HPRT1	0	kein C _T	3,52
	1:1	26,47	
	1:5	27,32	
	1:10	29,62	
	1:100	34,64	
	1:1000	37,82	
	1:10000	39,99	
	1:100000	kein C _T	
SDHA	0	kein C _T	3,95
	1:1	27,16	
	1:5	28,43	
	1:10	30,20	
	1:100	35,08	
	1:1000	38,73	
	1:10000	kein C _T	
	1:100000	kein C _T	

5.4.2 Entwicklung einer Therapieresistenz bei 15 Patienten (Teilstudie III)

Eine Gruppe von 15 Patienten (12 mit multizentrischem malignem Lymphom, zwei mit kleinzelligem Lymphom und einer mit Mycosis fungoides) wurde hinsichtlich der longitudinalen MDR1-Expressionsanalyse über die gesamte Chemotherapie begleitet. Die Studie lief über einen Gesamtzeitraum von 15 Monaten. Es wurden fast ausschließlich Lymphompatienten mit einem multizentrischen malignen Lymphom in die Studie aufgenommen, um die peripheren Lymphknoten als sicheres und einfach zu überwachendes Remissions-Progressions-Kriterium der Erkrankung zu verwenden. Zwei der Patienten in dieser Studie stellten jedoch eine Ausnahme dar. Beim ersten Studienpatienten wurde ein kleinzelliges Lymphom diagnostiziert und bei einem weiteren ein kutanes Lymphom. Diese Patienten wurden dennoch in die Studie aufgenommen, da die peripheren Lymphknoten vergrößert waren und daher

ein Monitoring des Remissions-Progressionsverhaltens auch hier möglich war. Alle 15 Hunde wurden regelmäßig klinisch einschließlich der Lymphknotenpalpation untersucht, um den Therapieerfolg und somit den Remissionsstatus zu evaluieren. Vor jeder Chemotherapie wurden Blutproben zur hämatologischen Überwachung genommen. Wenn praktikabel, wurden die Blutproben zusätzlich für die MDR1-Expressionslevel Analyse verwendet. Es konnten pro Hund zwischen zwei und elf Proben gewonnen werden. Durchschnittlich waren es fünf Proben pro Lymphompatienten. Die unterschiedliche Probenanzahl kommt einerseits durch die unterschiedlich intensive Zusammenarbeit mit den Haustierärzten zustande, so dass manche Hunde nur ein- bis zweimal im Zyklus in der Tierklinik Hofheim vorstellig wurden. Andererseits sind auch „Therapieabbrecher“ therapeutisch verfolgt worden, so dass hier keine maximale Blutprobenanzahl erreicht werden konnte.

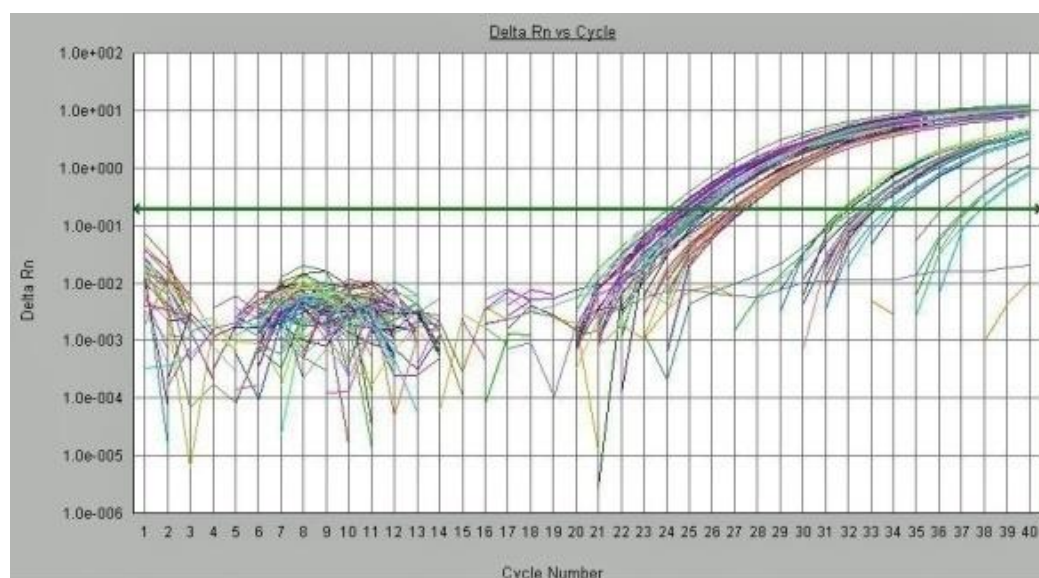


Abbildung 15: Real-time PCR Amplifikation von MDR1 und den Kontrollgenen HPRT1 und SDHA.

Das Bild zeigt einen repräsentativen Amplifikation Plot auf einer 96-Well Platte. Es ist erkennbar, in welchem Zyklus die einzelnen Kurven die waagerechte Linie schneiden (C_T -Wert), wodurch die Grundlage der Quantifizierung dargestellt wird.

Elf der 15 Hunde komplettierten das initiale Chemotherapie-Protokoll, obwohl sich darunter auch ein Hund lediglich in partieller Remission und ein weiterer im stabilen Tumorerkrankungsstatus befanden. Bei vier Hunden (Hund #8, #22, #24 und #26; siehe Tabelle 14, Seite 52) wurde die Chemotherapie im zweiten oder dritten Therapiezyklus aufgrund von Tumorprogression und zugrundeliegender Therapieresistenz abgebrochen. Abbildung 16 (Seite 68) gibt einen Überblick über den Verlauf der MDR1-Expressionslevel aller untersuchten Hunde.

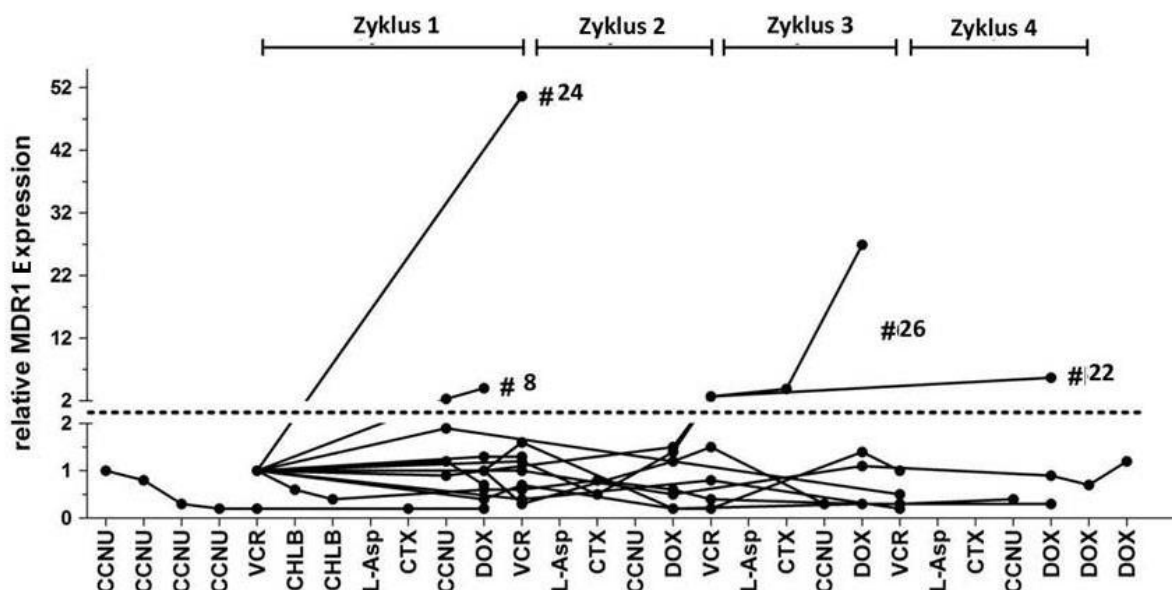


Abbildung 16: Verlauf der MDR1-Expression in Blutzellen unter Chemotherapie bei 15 Patienten.

Die Abbildung zeigt die Follow-up Analyse der MDR1-Expression während der gesamten Chemotherapie der Patienten mit malignem Lymphom. Die longitudinale MDR1-Expressionsanalyse wurde mit 15 Hunden während aller vier Therapiezyklen (1 bis 4) durchgeführt. Eine Ausnahme stellten diejenigen Patienten dar, bei denen aufgrund von gravierenden Nebenwirkungen oder Resistenzentwicklung die Therapie abgebrochen wurde. Im Rahmen der hämatologischen Routinediagnostik wurden vor jeder zytostatischen Therapie Blutproben genommen. Auf der x-Achse sind alle während der vier Therapiezyklen verabreichten Medikamente eingetragen (vgl. Tabelle 9, Seite 37) (CCNU = Lomustin, VCR = Vincristin, CHLB = Chlorambucil, L-Asp = L-Asparaginase, CTX = Cyclophosphamid, DOX = Doxorubicin). Chlorambucil ist nicht in Tabelle 9 aufgeführt, da es nicht zum initialen Chemotherapie-Protokoll gehört; es wurde lediglich einem Hund bis zur finalen Diagnosestellung verabreicht.

Die MDR1-Expressiondaten wurden dabei über die Expression der beiden Kontrollgene (Housekeeper) HPRT1 und SDHA normalisiert. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Expressionsdaten von beiden Housekeepern sind in der vorliegenden Arbeit lediglich die Daten für HPRT1 dargestellt.

Das basale MDR1-Expressionsniveau wurde für jeden Hund auf „1“ kalibriert, sodass der x-fache Anstieg bzw. Rückgang der MDR1-Expression auf der y-Achse abzulesen ist.

Drei der 15 Hunde erhielten ein von der initialen Chemotherapie abweichendes Behandlungsprotokoll:

Ein Patient erhielt viermalig in dreiwöchigen Abständen Lomustin, da ein kutanes Lymphom diagnostiziert wurde. Nach Vergrößerung der peripheren Lymphknoten wurde das initiale Chemotherapie-Protokoll begonnen.

Ein weiterer Hund erhielt nach einmaliger Vincristinapplikation zweimalig Chlorambucil, bevor das Lymphomprotokoll begonnen wurde. Vor der eigentlichen Diagnosestellung (kleinzelliges Lymphom) wurde der Hund bereits mit Vincristin antherapiert und dann die Behandlung mit Chlorambucil fortgesetzt. Da diese Therapie nach kurzer Zeit nicht mehr ansprach, musste dieser Patient auf das herkömmliche Lymphomprotokoll (vgl. Tabelle 9, Seite 37) umgestellt werden.

Bei Hund Nummer drei wurde zunächst mit dem Hofheimer Lymphomprotokoll begonnen, das aufgrund einer Vincristin-Unverträglichkeit durch eine Doxorubicin-Monotherapie nach dem zweiten Zyklus ersetzt wurde.

Die MDR1-Expressionslevel veränderten sich in den meisten Patienten nicht signifikant. Abweichend davon zeigten vier Hunde (#8, #22, #24, #26) einen 4-fachen bis 54-fachen Anstieg der MDR1-Expression unter Therapie (Abbildung 17).

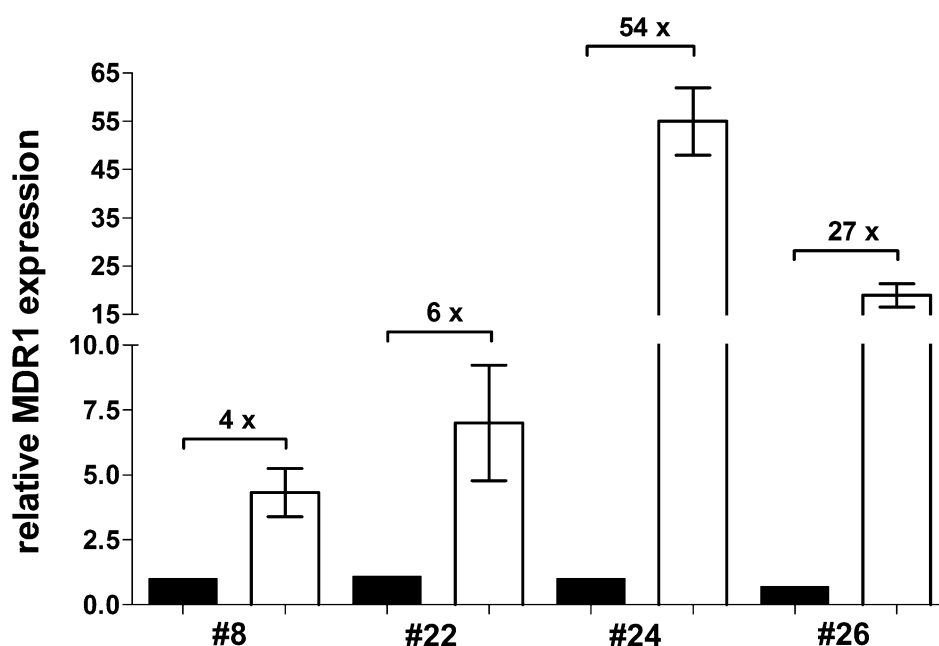


Abbildung 17: Relativer Anstieg der MDR1-Expression

Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der MDR1-Expression für alle vier Hunde, die eine Progression der Tumorerkrankung erfuhren. Die schwarzen Balken zeigen die basalen MDR1-Expressionslevel vor Beginn der Therapie, während die weißen Balken das Expressionsniveau zum Zeitpunkt der letzten Blutanalyse vor Beendigung der Behandlung darstellen.

Es ist interessant, dass es lediglich bei diesen vier Hunden zu einer Progression des Lymphoms kam, während sich die anderen Patienten in kompletter Remission (KR, n=9), partiell-

ler Remission (PR, Hund #18; vgl. Tabelle 14, Seite 52) oder in stabilem Erkrankungsstatus (SE, Hund #25; Tabelle 14) befanden (Abbildung 18).

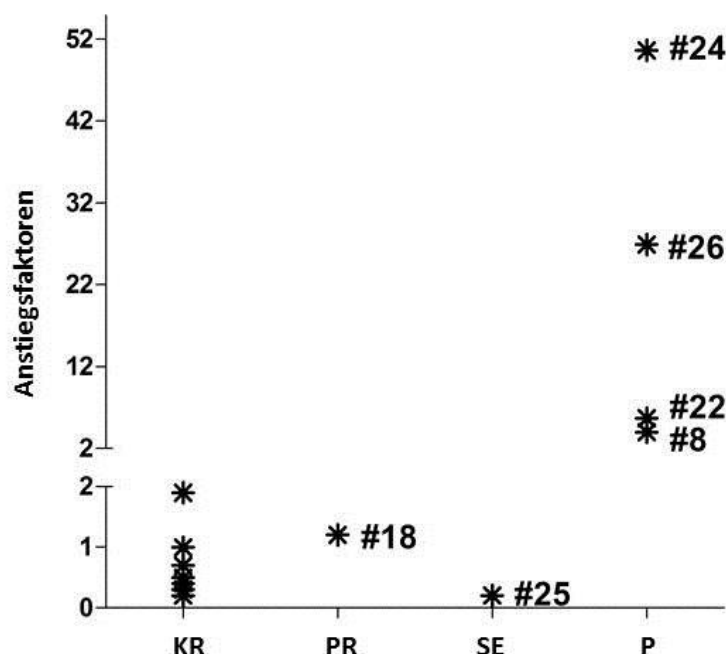


Abbildung 18: Korrelation der Anstiegsfaktoren mit dem Tumorstatus

Die Anstiegsfaktoren wurden für alle 15 Hunde berechnet und mit dem Therapieerfolg in Form des Tumorstatus korreliert (P = Progression der Tumorerkrankung, SE = Stabile Erkrankung, PR = Partielle Remission, KR = Komplette Remission). Alle vier Hunde mit Progression der Erkrankung, aber keiner der übrigen elf Patienten, hatten Anstiegsfaktoren > 2. Die jeweiligen Fälle, in denen es zur Progression kam oder die lediglich eine partielle Remission oder stabile Erkrankung erreichten, sind in der Abbildung mit ihren Nummern gekennzeichnet (Tabelle 14, Seite 52).

Um eine Korrelation zwischen klinischem Tumorstatus und einem Anstieg der MDR1-Expression herstellen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Cut-Off Wert bei zwei definiert. Dieser macht es möglich, die Hunde mit Tumorprogression (> 2) von denjenigen in kompletter Remission (< 2) zu separieren.

5.5 SEQUENZANALYSE MRP1

5.5.1 MRP1 Primer und Lokalisation

Entsprechend der full-length Amplifikation des MDR1-Leserahmens wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Primer etabliert zur Amplifikation des MRP1-Transkripts.

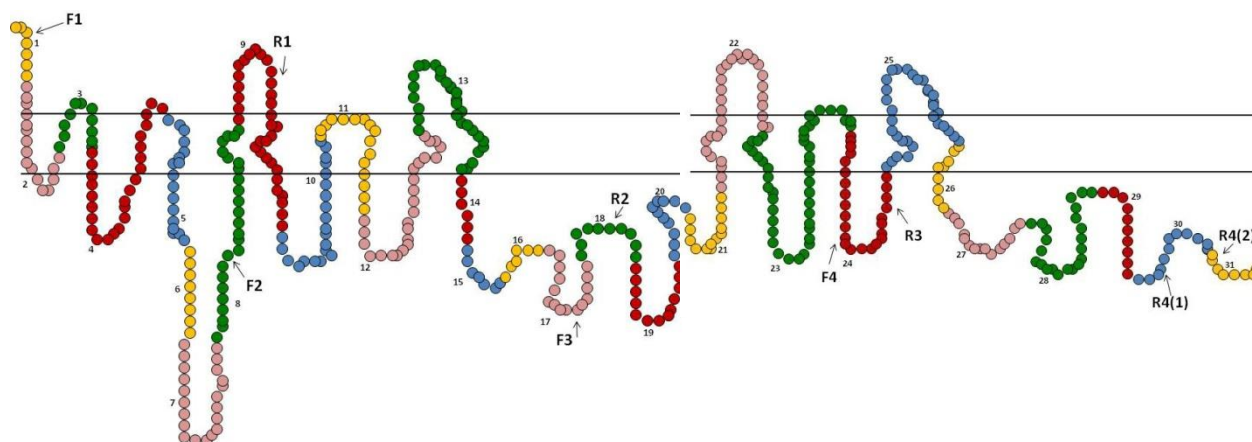
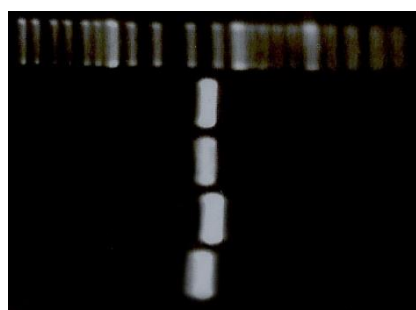


Abbildung 19: Lokalisation der verwendeten Primer im Membrantopologiemodell des MRP1-Proteins

Das MRP1-Protein wird auf 31 Exonen des MRP1-Gens codiert und besteht aus drei Transmembrandomänen, welche die Plasmamembran (schematisch durch die beiden Striche symbolisiert) durchdringen, und zwei Nukleotidbindedomänen. Darüber hinaus verfügt das MRP1-Protein im Gegensatz zu MDR1 über eine N-terminale Domäne, die mit den hydrophoben Membranregionen von MRP1 interagiert und von entscheidender Bedeutung für die Transportfunktion von MRP1 ist (Bakos et al., 2000). Extrazelluläre Proteinloops sind oben und interzelluläre Loops unten dargestellt. Weiterhin ist die Exonstruktur des MRP1-Gens farblich in der Proteinsequenz dargestellt. Die Lokalisation der verwendeten Primer ist angegeben und repräsentiert die Proteindomäne, die auf dem kodierenden MRP1-Transkript von der PCR-Reaktion mit den entsprechenden Primern erfasst wird. Die Darstellung orientiert sich am humanen MRP1-Gen.



Längensstandard

Fragment 1: 1200 bp, Primer F1-R1

Fragment 2: 1200 bp, Primer F2-R2

Fragment 3: 1100 bp, Primer F3-R3

Fragment 4: 1400 bp, Primer F4-R4(2)

Abbildung 20: Visualisierung der vier MRP1-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten MRP1-Transkripts

5.5.2 Polymorphismen im caninen MRP1-Gen

Die MRP1-Polymorphismenanalyse wurde an den gleichen 18 Patienten durchgeführt wie an denjenigen, die in der MDR1-Polymorphismenanalyse verwendet wurden (vgl. Tabelle 14, Seite 52). Die Einschlusskriterien für die MRP1-Sequenzanalyse waren die gleichen wie bei der MDR1-Analyse. Die Patientencharakteristika sind Tabelle 14 zu entnehmen und beschränken sich auf die Hunde 1 bis 18. Für alle Patienten wurden wiederum Sequenzierungen des kompletten MRP1-Leserahmens durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden

mit einer in GenBank eingetragenen Referenzsequenz [GenBank Accession No. NM_001002971] verglichen. Wie zuvor wurden alle Zielsequenzen nach PolyPhen und SIFT bewertet sowie anhand der individuellen Nebenwirkungsprofile evaluiert. Tabelle 20 (Seite 73) listet alle analysierten Polymorphismen im MRP1-Gen mit und ohne Aminosäuresubstitutionen auf.

Tabelle 20: MRP1-Polymorphismen von 18 Patienten

^a Nukleotid- und Aminosäurepositionen sind nach den Referenzsequenzen NM_001002971 (Nukleotide) und NP_001002971 (Protein) bezeichnet. ^b Sequenzmotive wurden wie folgt abgekürzt: TR=Transmembran-Region; W-B=Walker-B in ATP-binding site, ABC=ATP binding cassette. ^c Hunde, welche die Chemotherapie gut tolerierten. ^d Hunde, welche Nebenwirkungen unter der Chemotherapie zeigten. Homozygotes (hom) oder heterozygotes (het) Auftreten der Polymorphismen.

SNP ^a	Aminosäure- austausch ^a	Exon	Motiv ^b	PolyPhen Bewer- tung	SIFT Bewertung	Fälle	
						T ^c	NW ^d
T77C	silent	1				n=6 (hom)	n=1 (hom)
T453G	A149S	3	TR	benign; 0,135	tolerated; 1,00	n=1 (het)	
T521C	silent	4				n=1 (hom), n=1 (het)	n=1 (hom)
A746G	silent	6				n=7 (hom)	n=3 (hom)
A863G	silent	7				n=2 (het)	
A1582C	K525T	11	ABC	benign; 0,644	tolerated; 0,36		n=1 (het)
T1659C	F551L	11	TR	benign; 1,454	affect protein func- tion; 0,02	n=1 (hom), n=3 (het)	n=1 (hom), n=1 (het)
C2192T	silent	16				n=8 (het)	n=1 (hom), n=2 (het)
T2384G	D792E	17	W-B	probably damaging; 2,318	affect protein func- tion; 0,00	n=1 (hom)	
T2390C	silent	17				n=5 (hom), n=5 (het)	n=3 (hom)
G2785T	silent	20				n=1 (hom)	
T3158C	silent	22				n=6 (hom), n=5 (het)	n=2 (hom)
G3513C	silent	23				n=1 (het)	
G4142T	silent	28				n=2 (hom), n=2 (het)	
C4196T	silent	28				n=1 (hom)	
G4463C	silent	29				n=1 (het)	

In der nachfolgenden Abbildung wurden alle Substitutionen in dem Membrantopologiemodell des MRP1-Transporters lokalisiert und eingetragen.

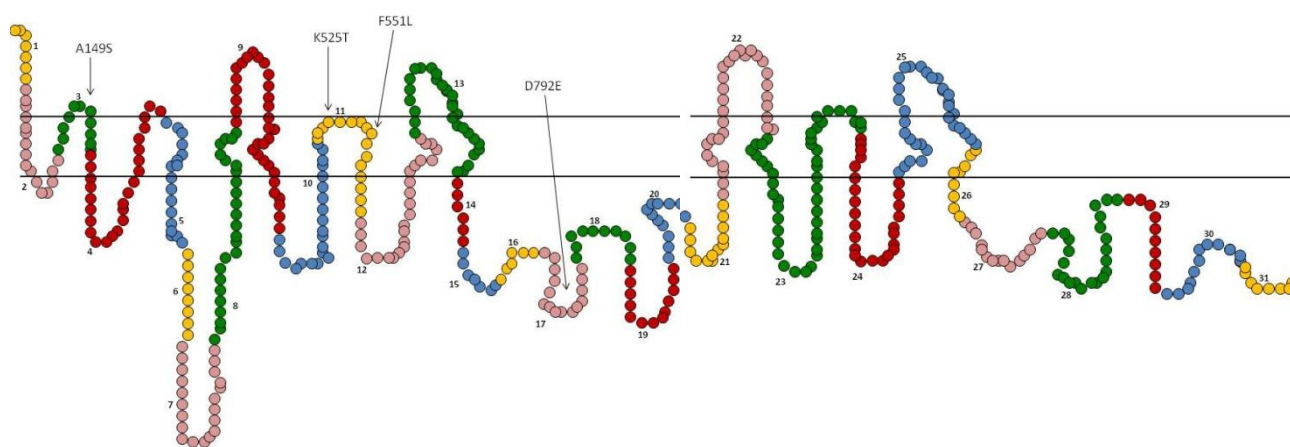


Abbildung 21: Membrantopologie des MRP1-Transporters und Lokalisation aller Aminosäuresubstitutionen

Um eine Korrelation zwischen Therapie-assoziierten Nebenwirkungen und SNPs im MRP1-Gen, die einen eventuellen Funktionsverlust verursachen, herstellen zu können, wurden auch hier eine PCR-Amplifikation und anschließende DNA-Sequenzierung der full-length MRP1-Transkripte von 18 Hunden durchgeführt. Wiederum standen Nebenwirkungen in Form einer Knochenmarksuppression und/oder gastrointestinaler Symptome nach Applikation verschiedener Zytostatika (vgl. Tabelle 9, Seite 37) im Vordergrund. Jede einzelne Sequenz wurde mit einer MRP1-Referenzsequenz, die in der GenBank Datenbank eingetragen ist, verglichen [GenBank Accession No. NM_001002971]. Alle identifizierten Polymorphismen sind in Tabelle 20 (Seite 73) aufgelistet. Wie bereits zuvor publiziert, wurden auch in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der PolyPhen und SIFT Algorithmen die detektierten SNPs hinsichtlich ihrer möglichen Auswirkung auf die Proteinfunktion bewertet (Wang et al., 2011). Insgesamt konnten 16 Polymorphismen identifiziert werden, von denen vier eine Aminosäuresubstitution verursachten: A149S, K525T, F551L und D792E. Die restlichen 12 SNPs sind demnach als „silent“ zu charakterisieren.

Die Mehrzahl der Polymorphismen wurde von den Bewertungsprogrammen PolyPhen und SIFT als „benign“ und „tolerated“ eingestuft. Lediglich bei zwei Aminosäuresubstitutionen (F551L und D792E) konnte mit Hilfe der Algorithmen beider Programme eine Auswirkung auf die Proteinfunktion evaluiert werden. Bei der Substitution F551L wurde dieser Effekt durch SIFT alleine („affect protein function“) bewertet. Hier waren sowohl Hunde, die die Chemo-

therapie sehr gut vertragen als auch Patienten, die Nebenwirkungen niedriger Toxizitätsgrade entwickelten, homozygot oder heterozygot betroffen.

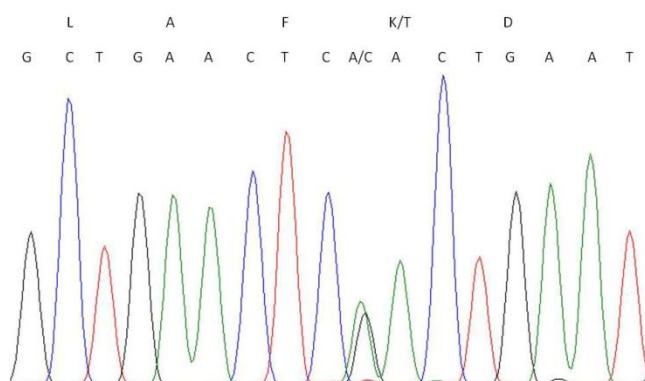


Abbildung 22: Repräsentatives Chromatogramm des heterozygoten Polymorphismus A1582C, welcher den Aminosäureaustausch K525T im MRP1-Protein verursacht.

Die Aminosäuresubstitution D792E wurde nach beiden bioinformatischen Bewertungsprogrammen als beeinträchtigend für die Proteinfunktion angegeben: „probably damaging“ und „affect protein function“. Bei der Substitution D792E war nur ein Hund homozygot betroffen, der jedoch keinerlei gravierende Nebenwirkungen zeigte.

Wie schon für die MDR1-Polymorphismen dokumentiert, dominierte auch hier keine der genannten Aminosäuresubstitutionen in Hunden, die deutliche Nebenwirkungen entwickelten, verglichen mit Patienten, die die Chemotherapie sehr gut vertragen haben. Aufgrund dessen wurden die identifizierten Polymorphismen bislang nicht mit Hilfe von funktionellen Transportassays näher charakterisiert.

5.6 EVALUIERUNG VON NEBENWIRKUNGEN BEIM CANINEN LYMPHOMPATIENTEN

Um eine repräsentative Studie hinsichtlich des Nebenwirkungsspektrums bei einer zytostatischen Chemotherapie beim malignen Lymphom des Hundes durchführen zu können, waren mehr Patienten notwendig als die in Tabelle 14 (Seite 52) aufgeführten 27 Hunde. Der Zeitraum von 15 Monaten, in denen alle Patienten aus Tabelle 14 therapiert und begleitet wurden, wurde daher auf einen Untersuchungszeitraum von insgesamt 36 Monaten ausgedehnt. Die in diesem Zeitraum therapierten 123 zusätzlichen Hunde wurden retrospektiv betrachtet. Dabei waren die genaue Diagnose, das Therapieprotokoll, Dosierungen, Prophylaxe und

die entstandenen Nebenwirkungen nach bestimmten Zytostatika-Dosierungen notiert worden. Nur bei Vorhandensein dieser detaillierten Informationen konnte der Patient in diese Studie aufgenommen werden. Insgesamt wurden die Nebenwirkungen von 150 Hunden von 51 verschiedenen Rassen evaluiert (Tabelle 21).

Tabelle 21: Rasseverteilung der 150 Lymphompatienten zur Evaluierung der Nebenwirkungen unter Chemotherapie

Hunderasse	Anzahl
Afghane	1
Akita Inu	1
Australian Cattle Dog	1
Australian Shepherd	3
Beagle	1
Berner Sennenhund	7
Bordeaux Dogge	2
Border Collie	3
Briard	3
Bullterrier	1
Cairn Terrier	2
Cocker Spaniel	2
Collie	2
Dalmatiner	1
Deutsch Drahthaar	1
Deutsche Dogge	1
Deutscher Schäferhund	1
Dobermann	2
Dogo Argentino	2
Entlebucher Sennenhund	1
Epagneul Breton	1
Flat Coated Retriever	2
Foxterrier	1
Französische Bulldogge	2
Golden Retriever	8
Goldendoodle	1
Irish Setter	2
Irish Wolfhound	1
Jack Russel Terrier	2
Königspudel	2
Labrador Retriever	6
Malinois	1
Mischling	51

Pitbull	1
Podenko	2
Pon	1
Rauhaardackel	1
Rhodesian Ridgeback	4
Riesenschnauzer	1
Rottweiler	8
Scottish Terrier	1
Shetland Sheepdog	1
Shi Tzu	1
Siberian Husky	1
Staffordshire Bullterrier	1
Tibet Terrier	2
Weißer Schäferhund	1
Welsh Springer Spaniel	1
Westhighland White	3
Yorkshire Terrier	1
Zwergschnauzer	1

In dieser Untersuchung wurden sowohl Hunde mit dem Hofheimer Initialprotokoll (siehe Tabelle 9, Seite 37) behandelt, als auch mit dem Rezidiv-Protokoll der Klinik (Tabelle 22).

Tabelle 22: Rezidiv-Protokoll der Tierklinik Hofheim zur Lymphomtherapie beim Hund

Zytostatika	Tag						
	1	7	17	27	34	48	55
Vincristin	x						
Cyclophosphamid		X					
Epirubicin			x				
Vincristin				x			
Lomustin					x		
L-Asparaginase						x	
Epirubicin							x

Die Nebenwirkungen der 27 Hunde aus der unter 5.1 beschriebenen Studie (vg. Tabelle 14, Seite 52) wurden durch engmaschige Untersuchungen meinerseits und durch die jeweils zuständigen Tierärzte der Tierklinik Hofheim überwacht. Die Aufzeichnungen der Blutuntersuchungen wurden vor allem hinsichtlich Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie evaluiert und in Grade eingeteilt (vgl. Tabelle 8, Seite 28). Hierzu wurde der in Anhang I angefügte Untersuchungsbogen verwendet. Weiterhin wurden die Besitzer gebeten, die in Anhang II (Seite 130-131) und III (Seite 132-133) angefügten Fragebögen bei der Erstuntersuchung bzw. bei den Folgeuntersuchungen auszufüllen, um Auskunft über das Allgemeinbefinden und eventuell aufgetretene gastrointestinale Symptome zu erhalten. Für die übrigen 123 Hunde, erfolgte das Ausfüllen sämtlicher Untersuchungsbögen retrospektiv ohne nachträgliche Besitzerbefragung.

Unter den insgesamt 150 Hunden befanden sich mehrheitlich Mischlinge (n=51), Berner Sennenhunde (n=7), Golden Retriever (n=8) und Rottweiler (n=8). Bei allen Hunden wurde ein malignes Lymphom mittels zytologischer und/oder histologischer Untersuchung verschiedener Stadien und anatomisch/klinischer Formen diagnostiziert. Wie bei den engmaschiger überwachten 27 Hunden, gab es auch hier Lymphompatienten, welche alle Therapiezyklen durchliefen und solche, bei welchen die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen oder Resistenzen abgebrochen wurde. Andere Patienten wiederum erhielten über die Initialtherapie hinaus sogenannte Rescue-Protokolle (s. 2.2; Tabelle 22). Eine Übersicht aller applizierten Zytostatika und eventuell daraus resultierende Nebenwirkungen der in 36 Monaten therapierten Hunde sind in Tabelle 23 (Seite 78) zusammengefasst.

Tabelle 23: Applikation von Zytostatika und resultierende Nebenwirkungen

Zytostatika	Summe des therapeutischen Einsatzes	Anzahl dokumentierter Nebenwirkungen	aufgetretene Nebenwirkungen (%)	therapierbare Nebenwirkungen (%)
Doxorubicin	380	68	17,9	53,5
Vincristin	457	91	19,9	57,1
CeCeNu	237	35	14,8	27,0
Endoxan	362	75	20,7	47,0

In Spalte zwei wird dem jeweiligen Präparat die Anzahl der einzelnen Applikationen zugeordnet. In Spalte drei ist die Anzahl entstandener Nebenwirkungen verschiedenster Symptome und Schweregrade aufgelistet; diese sind in Spalte vier in Prozentzahlen ausgedrückt. Die meisten Nebenwirkungen traten nach einer Therapie mit Cyclophosphamid (20,7 %) auf, während bei Lomustin nur 14,8 % Unverträglichkeitsreaktionen auftraten. Dies gibt jedoch keine Auskunft darüber, welche Symptome auftraten und wie schwerwiegend diese waren. Aus diesem Grund wurde zunächst in Spalte fünf errechnet, wie viel Prozent der bei einem bestimmten Präparat aufgetretenen Nebenwirkungen therapierbar waren. Als therapierbar wurde in dieser Studie die Tatsache definiert, dass durch einen prophylaktischen Einsatz von Antiemetika und Antidiarrhoika sowie durch eine Dosisreduktion des entsprechenden Zytostatikums geringergradige Nebenwirkungen verhindert werden konnten. Es war weiterhin interessant zu evaluieren, ob bestimmte Zytostatika in dieser Studie verstärkt eine Knochenmarksuppression oder eine gastrointestinale Symptomatik zur Folge hatten (Abbildung 23, Seite 79).

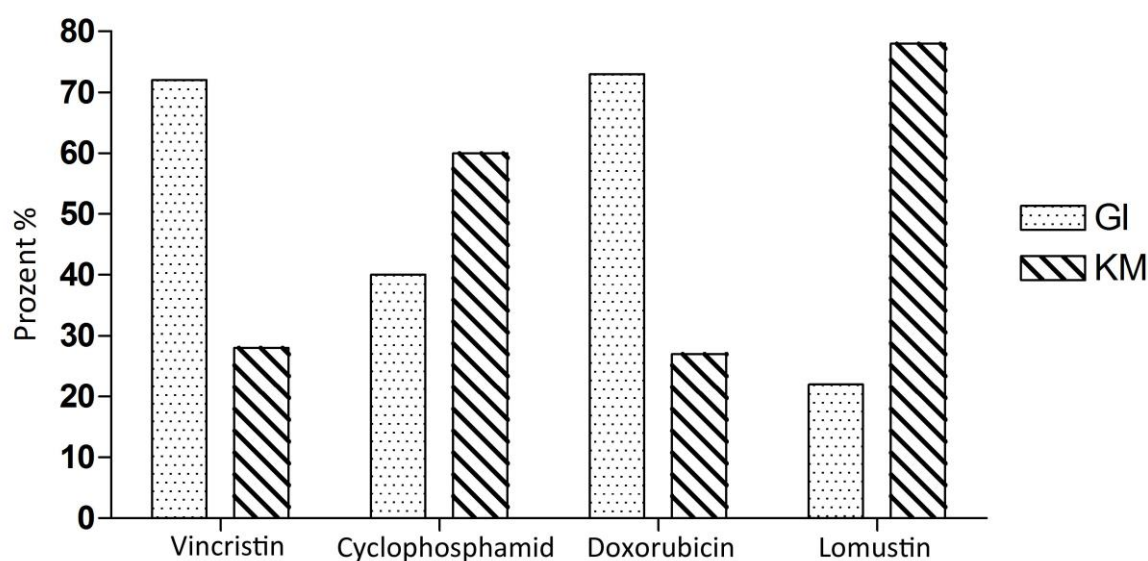


Abbildung 23: Knochenmarksuppression und GI-Symptome nach Zytostatika-Applikation bei Lymphompatienten

GI=gastrointestinale Symptome; KM=Knochenmarksuppression

Bei den Zytostatika Vincristin und Doxorubicin stehen die gastrointestinalen (GI) Nebenwirkungen im Vordergrund. So kam es nach einer Vincristin-Applikation bei 72 % und bei Doxorubicin bei 73 % zu GI-Unverträglichkeiten, während es bei 28 % im Falle von Vincristin bzw. 27 % im Falle von Doxorubicin zu einer Knochenmarksuppression kam. Ganz anders war diese Verteilung bei den Arzneistoffen Cyclophosphamid und Lomustin. Hier standen mit 60 % bei Cyclophosphamid und 78 % bei Lomustin Nebenwirkungen im Vordergrund, die das Knochenmark betrafen. Hingegen kam es bei 40 % (Cyclophosphamid) und 22 % (Lomustin) zur Entstehung von gastrointestinalen Beschwerden in Form von Vomitus und Diarrhoe.

Im Folgenden soll nun das individuelle Nebenwirkungsspektrum und die verschiedenen Schweregrade der Symptome eines jeden der vier Zytostatika beschrieben werden (Abbildung 24, Seite 81). Wie schon aus Abbildung 23 ersichtlich, standen bei Vincristin und Doxorubicin die gastrointestinalen Nebenwirkungen im Vordergrund, während es bei Cyclophosphamid und Lomustin verstärkt zu einer Knochenmarksuppression kam. Bei Vincristin kam es geringgradig häufiger zu Vomitus (n=32) als zu Diarrhoe (n=24) des Grades 1, während bei Doxorubicin eine Diarrhoe Grad 1 (n=29) häufiger vertreten war als Vomitus (n=12). Betrachtet man die unterschiedlichen Schweregrade an dieser Stelle, waren die bei Vomitus und Diarrhoe auftretenden Grade 2, 3 und 4 bei Vincristin und Doxorubicin ähnlich verteilt. Beim Symptom Diarrhoe war bei Vincristin zusätzlich Grad 4 (n=1) aufgetreten. Alle Patienten-

ten mit gastrointestinalen Symptomen des Grades 4 nach Vincristin und Doxorubicin (n=3) mussten stationär aufgenommen werden.

Im Gegensatz zu Vincristin und Doxorubicin kam es bei den anderen beiden Präparaten nicht zur stationären Aufnahme aufgrund von Vomitus oder Diarrhoe. Die beiden erstgenannten Zytostatika führten demnach nicht nur häufiger zu GI-Nebenwirkungen, sondern verursachten auch stärkere Nebenwirkungen in diesem Bereich. Cyclophosphamid verursachte bei drei Patienten einen Grad 2 Vomitus und bei fünf Patienten eine Grad 2 Diarrhoe. Bei Lomustin wurde bei einem Patienten eine Diarrhoe Grad 3 festgestellt. Zumeist waren jedoch ein Vomitus Grad 1 (Cyclophosphamid: n=10; Lomustin: n=2) und eine Diarrhoe Grad 1 (Cyclophosphamid: n=17; Lomustin: n=3) vertreten.

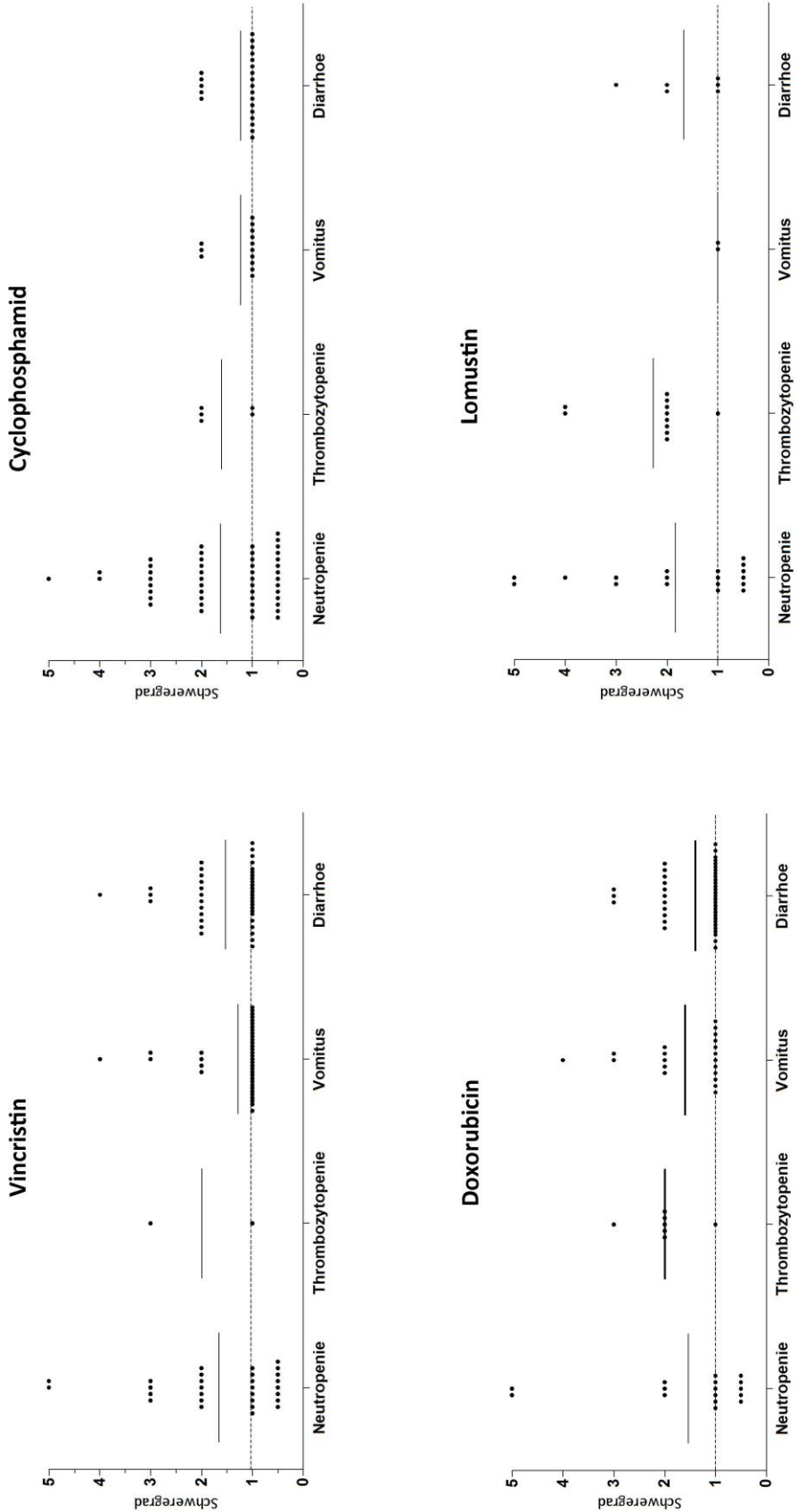


Abbildung 24: Schweregrade entstandener Nebenwirkungen nach verschiedenen Zytostatika im Rahmen der Lymphomtherapie

Das Nebenwirkungsspektrum (Neutropenie, Thrombozytopenie, Vomitus, Diarrhoe) wird auf der x-Achse angegeben und die Schweregradeinteilung (0 bis 5) nach Tabelle 8 (Seite 28) erfolgt auf der y-Achse. Bei der Neutropenie, anders als bei den restlichen drei Nebenwirkungssymptomen, ist der Grad 0,5 gleichbedeutend mit dem Schweregrad 1*. Die gestrichelte Linie bei Grad 1 wurde als Hilfslinie eingezeichnet, da hier die Gradeinteilung nach WHO- und VCOG-Kriterien beginnt. Die Schweregradeinteilung der WHO wurde für diese Auswertung modifiziert (siehe Tabelle 8, Seite 28).

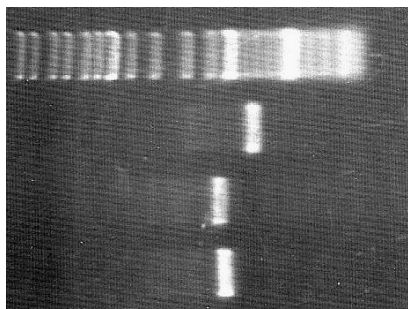
Bei einer Knochenmarksuppression waren in erster Linie die neutrophilen Granulozyten sowie die Thrombozyten betroffen; so kam es in 82 % bei allen vier Zytostatika zu einer Neutropenie. Obwohl die Knochenmarksuppression prozentual gehäuft bei Cyclophosphamid und Lomustin auftrat, wurden auch hier höhere Schweregrade bei Vincristin und Doxorubicin beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu den zuvor erläuterten gastrointestinalen Beschwerden. So trat bei sieben Patienten der Schweregrad 5 auf, verteilt auf die vier Zytostatika. Dieser Grad bezeichnet eine Neutrophilenzahl unter $0,5 \times 10^9/\text{L}$ und erfordert somit eine Antibiotikagabe und gegebenenfalls eine stationäre Aufnahme des Patienten bei febrilem Zustand und schlechtem Allgemeinbefinden. Mit 43 % war die Neutropenie aller Schweregrade bei dem Medikament Cyclophosphamid vertreten. Eine Thrombozytopenie trat vermehrt bei Lomustin ($n=11$) und Doxorubicin ($n=7$) auf. Der Schweregrad von 4, der den höchsten Schweregrad bei Thrombozytopenie beschreibt, trat bei zwei Patienten, welche mit Lomustin behandelt wurden, auf. Bei diesen Patienten wurden unter $25 \times 10^9/\text{L}$ gemessen und es bestand ein erhöhtes Risiko für spontane innere Blutungen. Bei Vincristin wurde eine Thrombozytopenie nur bei insgesamt zwei Patienten der Grade 1 und 3 festgestellt.

Während somit bei Doxorubicin und Vincristin gastrointestinale Nebenwirkungen im Vordergrund standen, kam es bei Lomustin vermehrt zu einer Thrombozytopenie. Die Neutropenie hingegen, obwohl bei Cyclophosphamid und Lomustin gehäuft vertreten, konnte bei allen Zytostatika in allen Schweregraden beobachtet werden und stellt aus diesem Grund die wichtigste Unverträglichkeitsreaktion auf eine zytostatische Chemotherapie dar.

5.7 SEQUENZANALYSE cKIT

5.7.1 cKIT Primer und Lokalisation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem das cKIT-Transkript von zehn Patienten in voller Länge amplifiziert und anschließend sequenziert (vgl. Tabelle 16, Seite 55). Die Position der verwendeten Primer wird im Topologiemodell der cKIT Rezeptortyrosinkinase angegeben (Abbildung 26a, Seite 88).



Längenstandard

Fragment 1: 800 bp, Primer F1(1)-R1(1)

Fragment 2: 1100 bp, Primer F2-R2

Fragment 3: 1050 bp, Primer F3-R3

Abbildung 25: Visualisierung der drei cKIT-Fragmente nach PCR-Amplifikation des kompletten cKIT-Transkripts

5.7.2 Polymorphismen und Mutationen im cKIT-Gen

In Tabelle 24 (Seite 84) sind alle bisher bekannten Mutationen im cKIT-Gen von Mensch und Hund zusammengefasst. Vielen davon wird eine pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung von Tumorerkrankungen zugesprochen (siehe Spalte „Konsequenz“).

Tabelle 24: Krankheitsrelevante Mutationen im cKIT-Gen bei Mensch und Hund

Aminosäurekürzel=Einbuchstabencode siehe Seite XI; ED=extrazelluläre Domäne; TS=Transmembransegment; JD=Juxtamembrane Domäne, PKD=Protein Kinase Domäne; AL=Activation Loop; SA=Sequenzanalyse; α C= α C-Loop; TTA=transiente Transfektions-Assays; R=Resistenz gegenüber STI-571 (Imatinib); RT=Resistenz-Test; /=keine Angabe in der Literatur.

Mutation	Lokalisation cKIT	Konsequenz	Test	Spezies	Referenz
501AA	ED	activating	/	Mensch	(Roskoski 2005)
502YY	ED	activating	/	Mensch	(Roskoski 2005)
V530I	TS	/	/	Mensch	(Boissan et al. 2000)
V559D	JD	Mis-sense Mutation	/	Mensch	(Roskoski 2005)
V560G	JD	/	Ba/F3-Zellen	Mensch	(Kitayama et al. 1995)
R586I	JD	/	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
G596D	JD	/	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
A617S	JD	/	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
K642E	α C	activating	/	Mensch	(Roskoski 2005)
V654A	PKD	R	RT	Mensch	(Roskoski 2005)
T670I	PKD	R	RT	Mensch	(Roskoski 2005)
T801I	PKD	activating + SCF	TTA	Mensch	(Kemmer et al. 2004)
C809D	PKD	/	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
D816V	AL	activating	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
D816Y	AL	activating	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
D816F	AL	activating	/	Mensch	(Boissan et al. 2000)
D816H	AL	activating	SA	Mensch	(Lorenzo et al. 2006)
D820G	AL	/	/	Mensch	(Roskoski 2005)
N822K	AL	activating	TTA	Mensch	(Kemmer et al. 2004)
Y823C	AL	activating + SCF	TTA	Mensch	(Kemmer et al. 2004)
Y823D	AL	activating	TTA	Mensch	(Kemmer et al. 2004)
E839K	AL	inactivating	/	Mensch	(Boissan et al. 2000)
CTG862CTC	AL	silent	/	Mensch	(Boissan et al. 2000)

ITD 417-421	ED	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
T425T	ED	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
Q430R	ED	/	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
Q442D	ED	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
S479I	ED	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
512 ins GNSK	ED	Splicevariante	C2-Zellen	Hund	(C A London et al. 1999)
N508I	ED	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
Del555-557InsV	JD	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
K557InsF	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
K557N InsP	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
K557R Del558-559	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
W556R	JD	activating	COS-7-	Hund	(Y. Ma et al. 1999)
Del 556-557	JD	activating	COS-7-	Hund	(Y. Ma et al. 1999)
Del V558	JD	activating	COS-7-	Hund	(Y. Ma et al. 1999)
ITD571-579	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD571-581	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD571-583	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD571-585	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD571-589	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-583	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-585	JD	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-586	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-587	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-588	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-589	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD572-590	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD573-585	JD	activating	Ba/F3-Zellen	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD573-590	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)

ITD573-591	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD575-582	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
ITD576-590	JD	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)
L575P	JD	activating	COS-7-	Hund	(Y. Ma et al. 1999)
Y577Y	JD	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
T606T	JD	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
T669T	JD	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
K785K	JD	/	/	Hund	(Letard et al. 2008)
D815V	AL	activating	SA	Hund	(Usher et al. 2009)
D815N	AL	activating	SA	Hund	(Usher et al. 2009)
K817R	AL	silent	SA	Hund	(Usher et al. 2009)
Del826-828InsD	AL	/	SA	Hund	(Letard et al. 2008)

In Tabelle 25 (Seite 87) sind alle Sequenzvariationen aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit durch Amplifizierung und Sequenzierung des kompletten proteinkodierenden Leserahmens bei Patienten identifiziert wurden. Die Tumordiagnostik erfolgte in jedem Fall mittels histologischer Untersuchung durch einen Pathologen. Eine Immunhistochemie mit cKIT-Färbung wurde bei den in Tabelle 16 (Seite 55) aufgeführten Tumoren nicht durchgeführt, da es bislang nur für Mastzelltumore definierte Standards gibt.

Die ermittelten Sequenzen wurden mit einer in GenBank eingetragenen Referenzsequenz [GenBank Accession No. NM_001003181] verglichen. Wie für MDR1 und MRP1 wurden auch hier alle Zielsequenzen nach PolyPhen und SIFT bewertet. Tabelle 25 (Seite 87) listet alle analysierten Polymorphismen im cKIT-Gen mit und ohne Aminosäuresubstitution auf. Dabei ist wiederum das betroffene Sequenzmotiv angegeben.

Tabelle 25: Sequenzvariationen im cKIT-Transkript, welche im Rahmen dieser Arbeit bei caninen Tumorpatienten identifiziert wurden

Alle ermittelten Polymorphismen wurden auf die Referenzsequenz (Nukleotide) NM_001003181 und (Protein) NP_001003181 bezogen. Die Einteilung der Sequenzmotive erfolgte mit Hilfe der Datenbank UniProt unter der Accession Nr. O97799. Aminosäurekürzel=Einbuchstabencode Seite XI; ED=Extrazelluläre Domäne; Ig-s=Immunglobulin-Domäne-Startregion; Ig=Immunglobulin-Domäne (I-V); ATP-bs=ATP-binding site; hom=homozygot; het=heterozygot

Sequenzvariation	Aminosäure-austausch	Exon	Motif	PolyPhen- Bewertung und-Score	SIFT- Bewertung und Score	Anzahl Patienten
G96A	R23Q	1	ED	Possibly damaging; 1,698	Tolerated; 1,00	n=3 (hom)
G604T	Q192H	3	Ig-s	Benign; 0,309	Tolerated; 1,00	n=1 (hom)
G781A	silent	4				n=2 (hom)
G1303A	silent	8				n=3 (hom)
G1353A	G442D	8	Ig	Possibly damaging; 1,565	Tolerated; 1,00	n=7 (hom)
C1395G	P456R	8	Ig	Possibly damaging; 1,900	Tolerated; 1,00	n=1 (hom)
1565 ins 12 bp (GTAACAGCAAAG)	512 ins GNSK	9	Ig	In-frame-insertion von 4 Aminosäuren		n=1 (hom)
C1759T	silent	11				n=3 (het)
C1846T	silent	12				n=4 (hom)
A2035T	silent	14				n=7 (hom)
C2355T	S772F	16	ATP-bs	Probably damaging; 2,569	Affect protein function	n=1 (het)

Insgesamt wurden bei zehn Sequenzvariationen fünf Aminosäuresubstitution ermittelt. In der nachfolgenden Abbildung wurden alle Substitutionen in die jeweiligen Proteindomäne eingezeichnet.

Abb. 26a

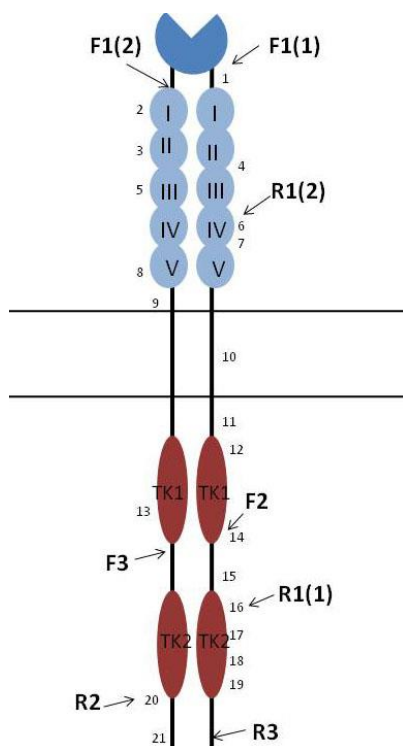


Abb. 26b

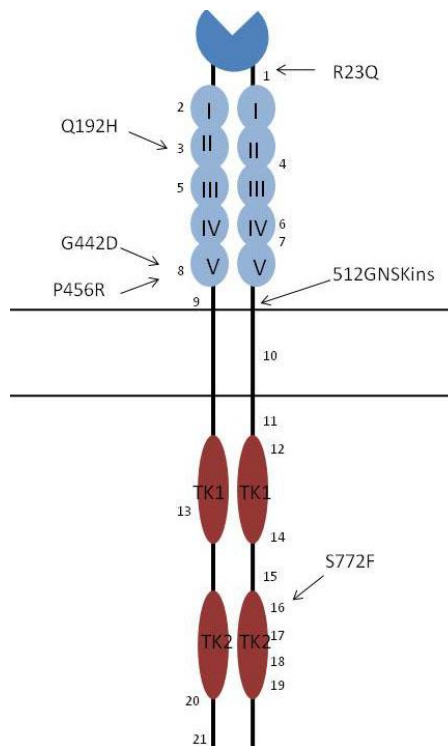


Abbildung 26a/b: Topologiemodell der cKIT-Rezeptortyrosinkinase

Der cKIT-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne mit der Ligandenbindungsdomäne (blau), einer Transmembrandomäne und den intrazellulär lokalisierten Tyrosinkinasedomänen TK1 und TK2 (rot). In Abbildung 26a ist mit Pfeilen angegeben, welcher für die gezeigte Proteindomäne kodierende Abschnitt des cKIT-Transkripts von den Primerpaaren amplifiziert wurde. In Abbildung 26b sind die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Aminosäuresubstitutionen eingetragen.

Laut der Berechnung der funktionellen Effekte der Aminosäuresubstitutionen wurden die Substitutionen R23Q (n=3), G442D (n=6) und P456R (n=1) nach PolyPhen als „possibly damaging“ eingestuft, während diese nach der SIFT-Bewertung als „tolerated“ bewertet wurden. Die beiden letzteren Substitutionen wurden in Exon acht identifiziert, das einen für den Hund mutationsreichen Bereich mit funktioneller Bedeutung darstellt. R23Q wird in Exon 1 des cKIT-Gens kodiert. Eine weitere Aminosäuresubstitution S772F wurde nach beiden Bewertungsprogrammen als „probably damaging“ bzw. „affect protein function“ bewertet. Dieser SNP befindet sich in Exon 16 und somit in einem Bereich in der Nähe von bereits charakterisierten aktivierenden Mutationen (gain-of-function Mutationen). Dieser Polymor-

phismus lag heterozygot in einem Osteosarkom vor. Alle vier Polymorphismen(R23Q, G442D, P456R und S772F) sind in dieser Studie erstmals identifiziert worden. Die Aminosäuresubstitution Q192H wurde nach beiden Bewertungsprogrammen als nicht funktionsbeeinflussend charakterisiert. Auch diese Substitution wurde in dieser Studie erstmals identifiziert.

Von einem Patienten (Hund 1) wurden zwei verschiedene Proben (Blutprobe 1a; Gewebeprobe 1b) entnommen. Bei diesem Hund lag in der Gewebeprobe (Hund 1, Probe b) eine 12 Baseninsertion vor („GNSK“, an Aminosäureposition 512), welche nicht in der Blutprobe (Hund 1, Probe a) detektiert werden konnte.

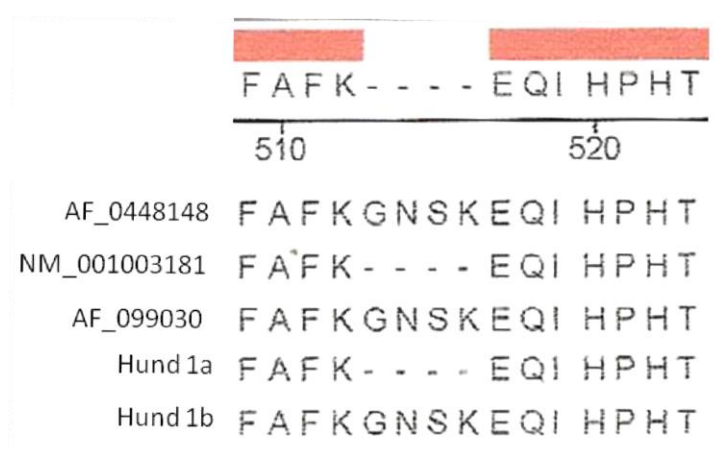


Abbildung 27: cKIT-Insertion "GNSK" bei Hund1 Probe 1b mit der Diagnose malignes Lymphom

In der Abbildung sind fünf Sequenzen dargestellt. Die erste und die dritte entsprechen den Referenzsequenzen AF0448148 und AF099030 mit Insert, während es sich bei der zweiten um die Referenzsequenz NM_001003181 ohne Insert handelt. Die vierte Sequenz entstammt aus einer Blutprobe des Hundes (1a) und die letzte aus einer Gewebeprobe desselben Hundes (1b).

6 Diskussion

„The recognition that an individual's genetic make up influences both the response to a medication and toxicity (pharmacogenetics) is not new, but applying the whole genome approach to this problem [...] may allow application of individualized medicine in the clinic. The promise of pharmacogenomics lies in maximizing the efficacy of a medical intervention while minimizing the toxicity. It is widely accepted that such a need is most pronounced in anticancer treatments [...]”. (Sauna et al., 2007)

6.1 CHEMOTHERAPIE UND IHRE NEBENWIRKUNGEN

Die allermeisten Zytostatika sind nicht wirklich krebsspezifisch wirksam. Sie richten ihre Aktivität gegen alle besonders schnell wachsenden Gewebe. (Krebsinformationsdienst, 2008)

Dieses Zitat stammt aus dem von dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) veröffentlichten Artikel „Nebenwirkungen und Langzeitfolgen der Chemotherapie: Kann man sie vermeiden?“, der Krebspatienten über das Risiko, Nebenwirkungen zu entwickeln, aufklärt.

Er spricht Patienten der Humanonkologie an und kann selbstverständlich nicht in gleichem Maße für die Veterinärmedizin angewandt werden. Wie eingangs erläutert, steht in der Tiermedizin eine Lebensverlängerung unter Erhalt der Lebensqualität im Vordergrund und nicht wie in der Humanmedizin die Heilung. Dennoch treten auch bei Hund und Katze Nebenwirkungen nach einer zytostatischen Chemotherapie auf. Die Ursache hierfür ist zunächst in der niedrigen therapeutischen Breite von Chemotherapeutika zu sehen, sodass Unverträglichkeitsreaktionen auch bei „sicheren Dosierungen“/„Standarddosierungen“ auftreten können.

In der Literatur existieren bislang nur sehr wenige Studien, die sich mit der Nebenwirkungshäufigkeit und –intensität nach verschiedenen Zytostatika-Applikationen beschäftigt haben (Valerius et al., 1997; Zemmann et al., 1998; Boyce und Kitchell, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem die Häufigkeit des Auftretens von Nebenwirkungen nach Zytostatika-Applikationen und deren toxisches Erscheinungsbild, eingeteilt nach Graden, erfasst. Die Evaluation umfasste 150 Hunde in einem Beobachtungszeitraum von 36 Monaten (vgl. Tabelle 21, Seite 76), wobei 27 dieser Hunde in 15 Monaten intensiv begleitet wurden (vgl. Tabelle 14, Seite 52). Wie bereits aus der Literatur bekannt, wurde bei den meisten Hunden ein multizentrisches Lymphom (ca. 86 %) des klinischen Stadiums IV/V (ca. 83 %)

und einem klinischen Substadium a (81 %) diagnostiziert (Greenlee et al., 1990). Bei der Untersuchung standen die Nebenwirkungen auf das Knochenmark (Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie) und diejenigen auf den Gastrointestinaltrakt (Vomitus, Diarrhoe) im Vordergrund. Es ist bereits aus anderen Studien bekannt, dass diese Nebenwirkungen am häufigsten auftreten und eine potentielle stationäre Aufnahme des Patienten zur Folge haben können (Sharma et al., 2005; Walji et al., 2008; Tomiyasu et al., 2010). Da der Fokus der Arbeit auf diesen Nebenwirkungen liegt, wurden vor jeder Chemotherapie ein hämatologisches Profil des Patienten und eine Befragung des Besitzers (Anhang II bis III, Seite 130-133) durchgeführt. Bei den 123 retrospektiv analysierten Hunden musste auf die Besitzerbefragung verzichtet werden, sodass die notwendigen Informationen (Diagnose, Therapieprotokoll, Dosierung, Nebenwirkungen, Blutbilder, Einsatz von Prophylaxe) aus den Karteieinträgen des easyVet Programmes (Hannover) an der Tierklinik Hofheim entnommen wurden.

Prozentual traten in absteigender Reihenfolge die meisten Nebenwirkungen nach Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Lomustin auf. Die Mehrzahl dieser Nebenwirkungen lässt sich durch Anwendung einer Prophylaxe vermeiden bzw. durch eine Dosisreduktion verhindern. In der Literatur wird eine Empfehlung zum Einsatz einer Prophylaxe zur Vermeidung zumeist niedriger Toxizitätsgrade (Neutropenie 1*, Thrombozytopenie, Vomitus und Diarrhoe Grad 1) ausgesprochen (Vail, 2009) und somit sind Nebenwirkungen niedriger Toxizitätsgrade häufig vermeidbar. Der Toxizitätsgrad Neutropenie 1* wurde jedoch eigens für diese Arbeit definiert und nicht aus der Literatur übernommen. Dieser definiert einen klinisch unkritischen Zustand, bei dem aber keine Chemotherapie erfolgte, weil sich dadurch das Risiko für den Patienten, Nebenwirkungen zu entwickeln, erhöhen würde.

Zudem konnte ein gehäuftes Auftreten gastrointestinaler Symptome bei Vincristin und Doxorubicin ermittelt werden, während bei Lomustin und Cyclophosphamid die Myelosuppression im Vordergrund stand. Die myelosuppressiven Eigenschaften von Lomustin und Cyclophosphamid sind bereits bekannt und in anderen Studien dokumentiert (Sharma et al., 2005; Heading et al., 2011). Die bei Lomustin im Vordergrund stehende Nebenwirkung auf das Knochenmark ist die Thrombozytopenie (Heading et al., 2011). In verschiedenen Studien zur Evaluierung der Nebenwirkungen von Vincristin steht zumeist die Neutropenie im Vordergrund (Northrup et al., 2002; Mealey et al., 2008), während in der vorliegenden Arbeit und einer weiteren Studie (Tomiyasu et al., 2010) ein ausgeprägtes Risiko für gastrointestinale Symptome gezeigt wurde. Für das Präparat Doxorubicin wird in einer humanmedizini-

schen Studie ein moderates Risiko für gastrointestinale Beschwerden beschrieben (Sharma et al., 2005) und in einer veterinärmedizinischen Arbeit bei Tomiyasu et al. sind diese, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, geringer als bei Vincristin ausgeprägt (Tomiyasu et al., 2010). Aufgrund der Studie von Tomiyasu et al. und den Ergebnissen dieser Dissertation lässt sich jedoch schließen, dass die Nebenwirkungen gehäuft bei Patienten in einem fortgeschrittenen Lymphomstadium (vgl. Tabelle 14, Seite 52) auftreten und dass diese Hunde aufgrund einer schweren Tumorinfiltration in das Darmgewebe bereits eine Vorschädigung dieser Organe aufweisen.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die Neutropenie als wichtigste Nebenwirkung anzusehen ist (Northrup et al., 2002; Walji et al., 2008), da sie bei allen vier Zytostatika in allen Toxizitätsgraden auftrat und in einigen Fällen mit einer Hospitalisierung einherging. Dies rechtfertigt die routinemäßige Blutentnahme vor jeder Therapie. Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit, dass bei Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium verstärkt gastrointestinale Symptome nach Gabe von Vincristin und Doxorubicin auftreten. So sollten hier sowohl eine gute Aufklärung des Patientenbesitzers durchgeführt als auch eine ausreichende Prophylaxe eingesetzt werden.

Nebenwirkungen, die weitaus seltener auftreten, sind die hämorrhagische Colitis nach Doxorubicin-Applikation (Vail et al., 2007), die bei den Patienten in der vorliegenden Arbeit nicht auftrat, und die hämorrhagische Zystitis nach Cyclophosphamid-Applikation (Vail et al., 2007). Letztere wurde bei 1,7 % der therapierten Hunde, die prophylaktisch mit einem Diuretikum (Furosemid) behandelt wurden, diagnostiziert und ist somit vergleichbar mit der in der Literatur publizierten Häufigkeit von 1,2 %, wenn Hunde die gleiche Prophylaxe erhielten (Charney et al., 2003). Erfolgte die Cyclophosphamid-Applikation ohne ein Diuretikum, stieg das Risiko der Patienten eine hämorrhagische Zystitis zu entwickeln auf 9 % an (Charney et al., 2003). Vergleichbare Daten konnten in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden, da alle Hunde zusammen mit dem Chemotherapeutikum das Diuretikum bekommen hatten. Sieben der 150 Patienten wurden aufgrund schwerer Nebenwirkungen stationär aufgenommen. Dies entspricht einem Prozentsatz von 4,6 %. Damit liegt die Anzahl der hospitalisierten Hunde in dieser Evaluation innerhalb der in der Literatur beschriebenen Referenzwerte zwischen drei bis fünf Prozent (Vail 2009). In einer sehr ähnlichen Studie der Tierklinik Hofheim von 2004 waren mit einem geringfügig abweichenden Protokoll (Hofheimer Protokoll I) mehr hospitalisierte Patienten (8,8 %) zu verzeichnen (Kessler und Kandel, 2004). Da sich diese

beiden Protokolle (I+II; letzteres wurde in dieser Arbeit verwendet), mit Ausnahme des jetzt neu dazugekommenen optionalen Lomustin-Einsatzes anstelle von Ara-Cell, sehr ähnlich sind, ist das Entstehen einer unterschiedlich hohen Hospitalisierungsrate nicht wirklich zu erklären. Denkbar ist jedoch ein verbessertes Monitoring des Patienten durch eine intensivere Zusammenarbeit mit dem Besitzer oder auch ein verstärkter Einsatz prophylaktischer Medikamente. Unter den in der vorliegenden Arbeit hospitalisierten Patienten befanden sich folgende Nebenwirkungen: febrile Neutropenie Grad 5 ($n=3$), Vomitus Grad 4 ($n=2$), Diarrhoe Grad 4 ($n=1$) und Thrombozytopenie Grad 4 mit petechialen Blutungen ($n=1$). Nicht alle Hunde mit derartigen Nebenwirkungen (insgesamt 12 Hunde) mussten hospitalisiert werden, da diese weder febril waren, noch klinisch ein schlechtes Allgemeinbefinden zeigten (vgl. Abbildung 24, Seite 81).

Die in dieser Studie verwendete Fallzahl von 150 Hunden ist vergleichbar mit der in anderen Studien zur Evaluierung eines Nebenwirkungsprofils (Kessler und Martin 2005: $n=57$; Northrup et al.: $n=147$; Heading et al.: $n=185$; Tomiyasu et al.: $n=40$) (Northrup et al., 2002; Tomiyasu et al., 2010; Heading et al., 2011; Kessler und Martin 2005).

Die Kombination an Chemotherapeutika und die angewandten Dosierungen im Hofheimer Initialprotokoll (vgl. Tabelle 9, Seite 37) sind in gleichem Maße verträglich wie etablierte Protokolle, z. B. COP und Madison-Wisconsin (vgl. Kapitel 2.2). Bei Evaluation der medianen Überlebenszeiten der Hunde konnten mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hofheimer Protokoll II (481 Tage) ähnliche Zeiten wie mit dem 2004 entwickelten Hofheimer Protokoll I (472 Tage; Kessler und Kandel, 2004) erzielt werden. Somit weisen die Hofheimer Protokolle vergleichbare und bessere mediane Überlebenszeiten auf als die in der Literatur beschriebenen, beispielsweise Madison-Wisconsin (357 Tage) oder COP (224 Tage). Abschließend kann daraus gefolgert werden, dass sich auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Hofheimer Initialprotokoll in eine Serie gut verträglicher und wirksamer Therapien einreicht und eine Alternative zu den in der Literatur beschriebenen darstellt.

Entscheidend für die Chemotherapieakzeptanz und somit den Therapieerfolg ist immer die Häufigkeit signifikanter Nebenwirkungen, die Therapieverträglichkeit (Mellanby et al., 2003). Wichtig für den Erfolg einer Chemotherapie in Bezug auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit sind die Aufklärung des Patientenbesitzers, ein geeignetes Patienten-Monitoring (Blutbild, Anamnese) sowie ausreichende Prophylaxe in Form von Antiemetika, Spasmolytika und

Diuretika und, falls erforderlich, eine Dosisreduktion. Auf diese Weise lässt sich das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen deutlich reduzieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Durchführung einer Chemotherapie ist die Kenntnis über bestimmte Rassen (Gramer et al., 2011), die ein höheres Risiko für die Entstehung von toxischen Reaktionen nach Vincristin und Doxorubicin haben als andere (Thamm und Vail, 2007). Diese Hunde weisen eine unterschiedlich hohe Allelfrequenz für das Auftreten der nt230(del4) MDR1-Mutation auf.

Zytostatika, die wie Vincristin und Doxorubicin als P-Glycoprotein Substrate gelten, dürfen bei Hunden mit homozygoter Mutation überhaupt nicht oder nur in geringeren Dosierungen eingesetzt werden.

In dieser Studie wurde der Einsatz von Zytostatika bei insgesamt drei Hunden mit einer MDR1-Mutation (zwei heterozygot und einer homozygot) begleitet und entstandene Nebenwirkungen kritisch bewertet. Alle drei Hunde sind nicht in Tabelle 14 (Seite 52) aufgeführt, da sie nicht für die drei Subanalysen verwendet wurden. Die beiden MDR1^{+/-}-Hunde, ein Australian Shepherd und ein Collie, wurden mit Hilfe des Hofheimer Initialprotokolls (vgl. Tabelle 9, Seite 37) mit einer 15%igen Dosisreduktion therapiert. Diese Dosierung war mit einer zusätzlichen prophylaktischen Versorgung (Maropitant - Cerenia, Butylscopolamin - Buscopan, bei Bedarf Metoclopramid - MCP, Furosemid - Dimazon) gut verträglich. Bei dem Collie hingegen musste die Therapie frühzeitig aufgrund einer Tumorprogression abgebrochen werden. Bei dem homozygoten Australian Shepherd lag ein indifferentes Lymphom mit einem hohen Anteil kleinzelliger Tumorzellen vor, sodass eine alternierende Therapie mit normaler therapeutischer Dosis Lomustin (70 mg/m²), Cyclophosphamid (200 mg/m²) und L-Asparaginase durchgeführt wurde. Es konnte beobachtet werden, dass, obwohl diese Arzneistoffe nach derzeitigem Kenntnisstand keine MDR1-Substrate darstellen, sich schneller eine hochgradige Thrombozytopenie (nach zweiter Lomustin-Applikation) und eine immer wiederkehrende Neutropenie nach Cyclophosphamid (bereits nach erster Applikation) einstellte, als dies der Erfahrung bei MDR1-intakten Hunden entspricht. Dies machte zunächst eine Dosisreduktion erforderlich und verursachte schließlich den Therapieabbruch.

Dieser Effekt konnte auch bei einem weiteren MDR1^{-/-} Collie, der in einer anderen Tierklinik therapiert wurde, beobachtet werden. Dieser wurde zunächst, da auf eine MDR1-Genotypisierung verzichtet wurde, mit einem Polychemotherapieprotokoll (u. a. bestehend

aus Vincristin und Doxorubicin) in normaler therapeutischer Dosierung behandelt. Daraufhin traten alle in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen auf (Mealey et al., 2008). Nach Abbruch der Therapie vergrößerten sich jedoch die Lymphknoten wieder. Da die Besitzerin eine weitere Therapie anstrebte, wurden dem Hund nach Rücksprache Cyclophosphamid und Lomustin verabreicht. Die Zytostatika wurden alternierend (Tag 0: Cyclophosphamid; Tag 7: Lomustin; Tag 28: Cyclophosphamid usw.) verabreicht und ein engmaschiges Monitoring in Form eines Blutbildes mit prophylaktischer Abdeckung des Hundes (Dimazon nach Cyclophosphamid) empfohlen. Auf eine weitere Prophylaxe wurde verzichtet. Die Cyclophosphamid-Applikation verlief problemlos und ging mit einem Tumorrückgang einher. Zehn Tage nach der CeCeNu-Applikation kam es jedoch zu Apathie, blassen Schleimhäuten, Hyperthermie und Leukopenie. Durch Antibiose konnte das Fieber zwar behoben werden, eine Verbesserung des Allgemeinbefindens des Collies trat aber nicht mehr ein, so dass er euthanasiert werden musste.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass auch die Präparate Cyclophosphamid und Lomustin bei Hunden mit einer nt230(del4) MDR1-Mutation mit Vorsicht anzuwenden sind und ein geeignetes Monitoring durchzuführen ist. Für die Zukunft sind weitere Anstrengungen notwendig, um für Hunde mit homozygotem MDR1-Defekt ein geeignetes Therapieprotokoll zu entwerfen. Hierbei könnten Zytostatika aus der Gruppe der Alkylantien (Cyclophosphamid, Lomustin), Antimetaboliten (Ara-Cell, Methotrexat) sowie Enzyme (L-Asparaginase) zum Einsatz kommen, was jedoch vermehrt zu einer Resistenzbildung führen könnte.

Zwar kann die Kombination von Lomustin und Cyclophosphamid mit L-Asparaginase mit einer vorsichtigen Anfangsdosierung durchaus empfohlen werden; dabei sollten aber stets das Allgemeinbefinden des Hundes seitens der Besitzer beobachtet sowie das Blutbild hinsichtlich neutrophiler Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und der Leberwerte kontrolliert werden. Der prophylaktische Einsatz von Antiemetika, Antidiarrhoika und Diuretika ist bei diesen Hunden von größter Wichtigkeit. Zudem wird in der Literatur grundsätzlich bei Chemotherapiepatienten eine prophylaktische Begleitung mit Granulozyten-Stimulans und Antibiotika diskutiert. In der Humanmedizin kommen derartige Stimulantien bei Patienten zum Einsatz, für die das Risiko, eine febrile Neutropenie zu entwickeln, über 20 % liegt. Die Gabe dieses Granulozyten-Stimulans ist in der Veterinärmedizin nicht ganz unproblematisch, da es nur entsprechende Humanpräparate gibt, die beim Hund zu Kreuzreaktionen des Immunsystems führen können. Die Diskussion um eine antibiotische Prophylaxe entfacht in der Hu-

manmedizin immer wieder brisante Debatten bezüglich der Resistenzsituation verschiedener Antibiotika. Bislang konnte eine veterinärmedizinische Studie ein geringfügig kleineres Risiko für eine Hospitalisierung durch prophylaktische Antibiose verzeichnen (Chretien et al. 2007). Daher besteht in der Veterinärmedizin gegebenenfalls die Indikation für entsprechende Präparate (Antibiose, Granulozyten-Stimulans) bei Hunden, die von der nt230(del4) MDR1-Mutation homozygot betroffen sind, da diese Patienten ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung von Nebenwirkungen haben.

6.2 INDIVIDUALISIERTE THERAPIE?

Die vorliegende Arbeit hat es sich, bezugnehmend auf die Lymphomtherapie des Hundes, zum Ziel gemacht Faktoren zu identifizieren, die eine Entwicklung von Nebenwirkungen und einer „Multi Drug“-Resistenz während einer Chemotherapie vorhersagen. Es werden wichtige Vorabinformationen für weitere größere klinische Studien geliefert.

In dieser Studie wurden eine Standard real-time PCR-Methode und PCR-Amplifikation unter Zuhilfenahme von RNA aus Blutzellen, die aus der hämatologischen Routinediagnostik stammten, angewendet. Auf diese Weise war keine zusätzliche Probenentnahme notwendig. Die Ergebnisse dieser MDR1-Expressionsanalyse können nun zur Vorhersage herangezogen werden, ob ein Patient dazu neigt, Nebenwirkungen oder eine „Multi-Drug“-Resistenz zu entwickeln, welche eine Tumorprogression und somit einen Therapieabbruch bedeuten kann. Aufgrunddessen können diese Ergebnisse eine Aussage über Verträglichkeit und Effektivität einer Chemotherapie bei Hunden mit malignen Lymphomen treffen. Eine Limitierung dieser Arbeit ist jedoch die Tatsache, dass nur 27 Patienten zur Identifizierung von Polymorphismen, zur Quantifizierung von basalen MDR1-Expressionsdaten und lediglich 15 Hunde für die longitudinale MDR1-Expressionsanalyse verwendet wurden.

6.2.1 Genetische Varianten nehmen Einfluss auf die Therapie

“Polymorphisms in the human genome contribute to wide variations in how individuals respond to medications, either by changing the pharmacokinetics of drugs or by altering the cellular response to therapeutic agents. The goal of the emerging discipline of pharmacogenomics is to personalize therapy based on an individual’s genotype” (Sauna et al., 2007).

In der Veterinärmedizin findet bereits eine individualisierte Therapie bei Hunden mit einer nt230(del4) MDR1-Mutation statt. Diese kann sowohl eine Behandlung mit makrozyklischen Laktomen als auch eine mit Zytostatika betreffen. Die Suche und Analyse von SNPs erfährt somit eine immer größer werdende Bedeutung auch in der Tiermedizin. Eingangs stellte sich die Frage, weshalb einige Patienten Nebenwirkungen entwickeln, die vergleichbar mit denen eines heterozygot oder homozygot von der nt230(del4) MDR1-Mutation betroffenen Hundes sind, jedoch den MDR1^{+/+} Genotyp haben.

Die vorliegende Arbeit konnte sowohl für das MDR1-Gen als auch für einen weiteren ATP-abhängigen Effluxtransporter, MRP1, mit ähnlicher Lokalisation und vergleichbarem Substratspektrum, einige Polymorphismen identifizieren.

Zur Identifizierung von SNPs, die das MDR1- oder MRP1-Expressionsniveau sowie die Transportfunktion dieser Carrier beeinflussten, wurden full-length MDR1- und MRP1-Transkripte von 18 Hunden sequenziert. Im Allgemeinen gilt, dass eine Korrelation zwischen spezifischen SNPs mit der RNA Expression oder der Funktionalität des Proteins schwer herzustellen ist (Kerb, 2006; Sakurai et al., 2007). Es gibt nur wenige Beispiele, in denen eine klare Beziehung aus der Sequenzanalyse alleine resultiert. Dies liegt beispielsweise bei der bekannten nt230(del4) MDR1-Mutation vor, welche zu einem vorzeitigen Stopcodon führt und somit verhindert, dass ein funktionaler Effluxtransporter entsteht (Mealey et al., 2001). Unabhängig von diesem wurde die Existenz weiterer funktionell relevanter MDR1- und MRP1-SNPs in Arzneistoff-sensitiven Hunden diskutiert (Bissonnette et al., 2009; Geyer und Janko, 2012; Mueller und Bettenay, 1999; Ma et al., 2002).

In dieser Studie konnten im MDR1-Gen insgesamt 17 Polymorphismen identifiziert werden, davon acht silent SNPs (vgl. Tabelle 18, Seite 60). Wenngleich diese die Aminosäuresequenz nicht verändern, können sie dennoch relevant sein. So sind in der Humanmedizin einige synonyme SNPs bekannt (unter anderem 1236C>T, 3435C>T), deren Auswirkungen kontrovers diskutiert werden (Macdonald und Gledhill, 2007). Diskutiert wird weiterhin die Auswirkung verschiedener Kombinationen der SNPs (sog. Haplotypen), welche zum Teil gehäuft in unter-

schiedlichen Populationen auftreten (Sauna et al., 2007), sowie das Potential von „silent“ SNPs die mRNA Stabilität und die Translation zu beeinflussen (Macdonald und Gledhill, 2007). Aufgrund entsprechender humanmedizinischer Studien (Hoffmeyer et al., 2000) gibt es bereits Hinweise, dass auch silent SNPs die MDR1-Expression beeinflussen können.

Neben den acht im MDR1-Gen identifizierten silent SNPs konnten neun mit einer Aminosäuresubstitution ermittelt werden. Auf diesen Polymorphismen lag der Fokus dieser Arbeit, da sie ähnlich anderer in der Humanmedizin identifizierten SNPs die Proteinfunktion beeinträchtigen könnten (Fromm, 2002). Mit Hilfe der individuellen Nebenwirkungsprofile der Hunde und den bioinformatischen Programmen PolyPhen (1) und SIFT (2) wurde versucht, deren funktionelle Bedeutung einzuschätzen. Aufgrund der Bewertungsprogramme konnte ein Ranking über eine etwaige Konsequenz der SNPs für die Proteinfunktionalität in absteigender Reihenfolge angegeben werden:

(1) R532Q, P212R, I1273V, F90Y, K621N, M1147V, T329S, V192I, S696P

(2) K621N, T329S, M1147V, V192I, P212R, F90Y, R532Q, S696P, I1273V

Es fällt auf, dass die Bewertungsprogramme ein größtenteils gegensätzliches Ranking für die identifizierten SNPs angeben. Wie bereits eingangs erläutert, basiert die Bewertung von SNPs durch die Programme PolyPhen und SIFT auf zum Teil sehr unterschiedlichen Kriterien, welche für dieses differierende Ranking verantwortlich sind. Zudem zeigt die vorliegende Arbeit anhand der identifizierten Polymorphismen, dass es bei der Spezies Hund eine stärkere Variation im MDR1-Gen zwischen den einzelnen Hunderassen gibt als für das MRP1-Gen. In einer Studie von Han et al., welche mit der vorliegenden Arbeit methodisch vergleichbar ist, konnten ebenfalls sechs der identifizierten SNPs (V192I, P212R, T329S, R532Q, S696P, I1273V) mit Aminosäuresubstitution nachgewiesen werden. Die Sequenzen wurden ebenso wie in dieser Arbeit mit der MDR1-Wildtyp Sequenz eines Beagle (GenBank Accession No. NM_001003215) verglichen. Weiterhin zeigte diese Studie die in der vorliegenden Arbeit ermittelte „AAT“ Insertion an Position 141 des Leserahmens. Diese wird von Han et al. für eine Ivermectinüberempfindlichkeitsreaktion bei einem Border Collie verantwortlich gemacht, da die „frame-shift“-Mutation weder in den sieben anderen Border Collies noch in der bei GenBank eingetragenen Referenzsequenz (NM_001003215) nachgewiesen werden konnte. Da das „AAT“ Insert nur bei einem Ivermectin-sensitiven Hund auftrat, wurde vermutet, dass diese Mutation ursächlich für die Nebenwirkungen verantwortlich sein musste,

während die restlichen Polymorphismen mit Aminosäuresubstitution aufgrund der Häufigkeit des Auftretens lediglich eine Genvariation darstellen sollten. In dieser Dissertation konnte das „AAT“ Insert bei mehr als der Hälfte ($n=12$) der Hunde unterschiedlicher Rassen (Afghane, Jack Russel Terrier, Australian Shepherd, Collie, Labrador Retriever, Rhodesian Ridgeback, Border Collie, Malinois, Mischling) nachgewiesen werden. Da viele von diesen eine gute Verträglichkeit der Chemotherapie zeigten, kann eine funktionelle Relevanz, wie von Han et al. beschrieben, angezweifelt werden.

Im Vergleich zu MDR1 konnte im MRP1-Gen ein deutlich größerer Anteil (12 von 16) an silent Polymorphismen identifiziert werden. Zudem waren wesentlich mehr Hunde heterozygot von SNPs betroffen als homozygot. Ebenso wie für MDR1 wurde auch in dieser Gen-Analyse anhand des individuellen Nebenwirkungsprofils sowie nach PolyPhen (1) und SIFT (2) eine Bewertung der SNPs mit Aminosäuresubstitutionen durchgeführt. Es konnte ein Ranking über eine etwaige Konsequenz der SNPs für die Proteinfunktionalität in absteigender Reihenfolge ermittelt werden:

(1) D792E, F551L, K525T, A149S

(2) D792E, F551L, K525T, A149S

Im Gegensatz zum Polymorphismen-Ranking bei MDR1 fällt auf, dass die bioinformatischen Bewertungsprogramme für MRP1 das gleiche Ergebnis liefern. Betrachtet man die Sequenz-homologien von Hunden verschiedener Rassen für das MRP1-Gen, so ist die Genvarianz des Proteins zwischen den Hunderassen geringer als für MDR1.

Außerdem ist zu bemerken, dass mit Ausnahme des F551L SNPs, der bei sechs Hunden identifiziert wurde, die restlichen drei Polymorphismen jeweils bei nur einem Hund nachgewiesen wurden. Aus einer veterinärmedizinischen Studie von Ma et al. aus dem Jahre 2002 waren bereits der A149S Polymorphismus und auch vier der silent SNPs (in vorliegender Arbeit: T77C, T521C, A746G, T3158C) bekannt (Ma et al., 2002). Zum besseren Vergleich der beiden Studien sind die unterschiedlichen Basenpositionen im Gen (Studie von Ma et al.: T69C, T523C, A738G, T3150C) zu beachten, die durch ein Alignment unterschiedlicher Referenzsequenzen entstehen. Ma et al. untersuchten in ihrer Studie weiterhin die Bedeutung des A149S Polymorphismus mit Hilfe von Uptake-Transportversuchen, da sich dieser in der vierten Transmembrandomäne (TM4) befindet, in der Mutationen ein verändertes Resistenzverhalten gegenüber Arzneistoffen verursachen könnten (Loo und Clarke, 1993). Für die

Aminosäuresubstitution an Position 149 konnte jedoch kein Effekt bezüglich eines veränderten Resistenzprofils nachgewiesen werden (Ma et al., 2002).

Im Gegensatz zum MDR1-Transportergen liegt der Forschungsschwerpunkt von MRP1 in der Human- und Veterinärmedizin nicht auf der Identifizierung von SNPs zur Aufklärung von Arzneistoffunverträglichkeiten und Arzneistoffinteraktionen, sondern auf der Erforschung ihrer Bedeutung für die Resistenzentwicklung (Mahjoubi et al., 2008; Yin et al., 2009; Fukushima-Uesaka et al., 2007). Im MRP1-Gen wurden SNPs, vor allem in Introns und nicht-kodierenden Regionen, identifiziert (Conseil et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit war es leider nicht möglich, einen Polymorphismus zu identifizieren, der vermehrt in Hunden mit schwerwiegenden Nebenwirkungen im Vergleich zu Tieren ohne Unverträglichkeitsreaktionen auftrat. Für eine endgültige Klärung hinsichtlich der Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten SNPs im MDR1- und MRP1-Gen müssen nach Klonierung und stabiler Transfektion funktionelle Messungen durchgeführt werden. Wie aus der Literatur hervorgeht ist weiterhin zu empfehlen, neben der Polymorphismen-Identifizierung in Exons auch die Introns zu untersuchen. Für eine abschließende Einschätzung der Bedeutung von Polymorphismen müssen unbedingt auch silent SNPs in den Genen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf das Expressionsniveau berücksichtigt werden.

Nachfolgende Untersuchungen, die sich mit der Erforschung einer Korrelation zwischen Arzneistoff-assoziierten Nebenwirkungen und Polymorphismen beschäftigen, sollten berücksichtigen, dass neben MDR1 und MRP1 verschiedene andere Transporter-Proteine (u. a. MRP2, BCRP, OATPs) und auch metabolisierende Enzyme (u. a. CYP-Isoformen in der Leber) einen Effekt auf die Arzneistoff-Distribution, -Elimination und -Metabolisierung ausüben. So können viele unterschiedliche Gene am Zusammenspiel der Entstehung von Nebenwirkungen beteiligt sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass SNPs auch Einfluss auf die mRNA Stabilität und Translation nehmen können (Macdonald and Gledhill 2007), sodass es aufgrund eines veränderten Expressionsprofils der Transporter-Proteine ebenfalls zu einer verringerten oder erhöhten Transportrate kommen kann.

6.2.2 MDR1-Expressionsniveau als Ursache für die Therapieunverträglichkeit

Betrachtet man vergleichend verschiedene Studien aus der Literatur, die sich mit der Analyse unterschiedlicher Expressionslevel von MDR1 in Tumoren beschäftigen, verfolgen diese

zumeist das Ziel, ein erhöhtes Expressionsniveau mit einer Therapieresistenz zu korrelieren (Tomiyasu et al., 2010; Fujimaki et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde das MDR1-Expressionsniveau von 27 Hunden, die zu einem Großteil zur Polymorphismenanalyse im MDR1- und MRP1-Gen herangezogen wurden, zur Beurteilung der drei eigens für diese Arbeit etablierten Nebenwirkungskategorien (T, mNW, sNW) verwendet. Die Studie sollte darstellen, ob eine aberrante Genexpression ebenfalls ursächlich für eine eingeschränkte MDR1-Effluxfunktion sein kann.

Um das MDR1-Expressionsniveau in der vorliegenden Arbeit bestimmen zu können, wurden eigens für diese Studie drei neue Expressionsassays (siehe Tabelle 7, Seite 26) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zur MDR1-Detektion in Blutzellen etabliert. Die internen Kontrollen (Housekeeper) wurden nach bereits publizierten Richtlinien zur Auswahl geeigneter Normalisierungs-Kontrollgene hinsichtlich stabiler Expression in Zielzellen und Amplicon-Längen-Ähnlichkeit zum Zielgen ausgewählt (Logan et al., 2009; siehe Kapitel 4). HPRT1 und SDHA wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund von erfolgreichen RT-PCR-Ergebnissen, die mit humanen Retikulozyten und Neutrophilen aus Blutproben erzielt wurden, für die Genexpressionsanalyse ausgesucht (Silver et al., 2006; Zhang et al., 2005). Die Möglichkeit, mit Hilfe des TaqMan 7300 eine quantitative real-time RT-PCR zur Analyse der MDR1-Genexpression aus Blut durchzuführen, stellte eine in der Literatur zu diesem Zweck neuwertige und für das Tier minimal invasive Technik dar. Auch seitens der Besitzer wurde diese Methode unterstützt, da keine zusätzlichen Biopsieentnahmen notwendig waren. Bislang erfolgte die Genexpressions-Bestimmung stets aus Zellen oder Gewebe (Cordon-Cardo et al., 1990; Lee et al., 1996; Moore et al., 1995; Burger et al., 2003; Kourti et al., 2007) und war aus diesem Grund nicht über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, wie dies unter anderem für die nachfolgenden Resistenzstudien (siehe 6.2.3) in der vorliegenden Arbeit notwendig war.

In Teilstudie I konnten niedrige basale MDR1-Expressionslevel, die vor Beginn der Chemotherapie erhoben wurden, mit dem Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen korreliert werden.

Es konnte bereits in anderen Studien unter Verwendung von Lymphknotengewebe gezeigt werden, dass die MDR1-Expressionslevel zu Beginn der Chemotherapie sehr variabel sind (Culmsee et al., 2004; Moore et al., 1995; Lee et al., 1996; Miller et al., 1991). Allerdings kor-

relierten diese Studien die evaluierten Expressionsdaten entweder nicht mit der klinischen Zytostatikaverträglichkeit oder diese verwendeten Antikörper-basierte Detektionsmethoden, wie beispielsweise Immunhistochemie und Western Blot. Diese Methoden erlauben jedoch keine adäquate Quantifizierung der Expressionslevel.

In der vorliegenden Arbeit, in der die RNA aus peripheren Blutzellen für die real-time RT-PCR verwendet wurde, konnte die hohe Variabilität der MDR1-Expressionslevel auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Dieses Expressionsniveau diene als stellvertretender Parameter für die MDR1-Expression in anderen Geweben (Gastrointestinaltrakt, hämatopoietische Stammzellen), das relevant für die Entwicklung von Nebenwirkungen ist. Es werden verschiedene Faktoren in dieser und vorangegangenen Arbeiten diskutiert, die für die Variabilität der interindividuellen basalen MDR1-Expressionslevel verantwortlich sein können. Im Wesentlichen werden zwei Faktoren, die eine aberrante Genexpression verursachen können, diskutiert. Zum einen kommen Studien aus dem Bereich der Humangenetik zu dem Ergebnis, dass Polymorphismen im Promotor-Bereich zu einer verminderten oder vermehrten Genexpression führen können (Murken et al., 2006). Die Promotorbereiche der MDR1- und MRP1-Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht, sondern lediglich solche im proteinkodierenden Leserahmen. Weitere humanmedizinische Studien belegen, dass Polymorphismen in der Promotorregion von verschiedenen DNA-Reparatur-Genen die Stabilität des MDR1-Transkriptes beeinflussen können und somit eine veränderte Genexpression zur Folge haben können (Kinslow et al., 2008). Zu diesem Thema gibt es keine vergleichbaren Daten aus der Veterinärmedizin. Zum anderen können Zytostatika das Expressionsniveau der untersuchten Zielgene beeinflussen. Aus der Humanonkologie ist bekannt, dass verschiedene Zytostatika durch eine Methylierung in der Promotorregion zu einer Verminderung des Genexpressionnniveaus führen (Efferth et al., 2001; Ando et al., 2000). Darüber hinaus ist erforscht, dass ein Medikamenteneinsatz vor der Chemotherapie bereits zu Alterationen im MDR1-Expressionsniveau führen kann (Gottesman et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit neigten Hunde mit niedrigem basalen MDR1-Expressionslevel in peripheren Blutzellen zur Entwicklung massiver Zytostatika-Unverträglichkeitsreaktionen. Dieses Resultat war erwartet, da Hunde mit komplettem Funktionsverlust des MDR1-Effluxtransporters (MDR1^{-/-} Hunde) anfälliger für Neutropenien und Thrombozytopenien nach einer Vincristinbehandlung sind als MDR1^{+/+} Hunde. Dies macht die Bedeutung von

MDR1 für die Arzneistoffüberempfindlichkeit deutlich (Mealey et al., 2008; Mealey et al., 2003; Krugman et al., 2012).

Insgesamt entwickelten fünf Patienten gravierende Nebenwirkungen. Alle zeigten einen homozygot intakten MDR1^{+/+} Genotyp und gehörten keiner Hunderasse an, welche vom MDR1-Gendefekt betroffen ist.

Für nachfolgende Studien ist daher zu empfehlen, neben den Exonregionen auch die Promotor- und gegebenenfalls auch die Intronregionen zu analysieren. Sollten SNPs in der Promotorregion dieser fünf Hunde nachgewiesen werden, würden diese als Ursache für das niedrige MDR1-Expressionsniveau in Frage kommen. Ein weiterer wichtiger Aspekt zur besseren Vergleichbarkeit mit Literaturdaten und zur Bestätigung der in der vorliegenden Arbeit aus Blutzellen gewonnenen Daten wäre die Bestimmung des MDR1-Expressionsniveaus aus Gewebeproben.

Eine wirksame und gut verträgliche Therapie für Patienten zu ermöglichen, die zum Teil sehr kleinen Subpopulationen angehören, stellt das Ziel zahlreicher Untersuchungen dar, obwohl die Verwirklichung einer individualisierten Therapie mit einem hohen wissenschaftlichen und finanziellen Aufwand verbunden ist. In diesem Zusammenhang soll abschließend auf folgendes Zitat von Prof. M. Rothenberg verwiesen werden: „...wird künftig nicht mehr reichen, eine Gewebeprobe zu entnehmen und dann mit Hilfe eines Mikroskops zu entscheiden, ob es sich um Tumorgewebe handelt. Mit Hilfe von Biomarkern müssen die konkreten genetischen Abnormalitäten bestimmt werden. Nur dann kann man zum Beispiel entscheiden, ob ein Brustkrebs mit einer Chemotherapie, einem Hormon oder einem anderen Medikament behandelt werden soll. Wir müssen allerdings offen eingestehen, dass es bei den allermeisten Krebserkrankungen dieses detaillierte Wissen über die molekularbiologischen Prozesse und Signalwege noch gar nicht gibt.“ (Welt Online; Interview mit Prof. M. Rothenberg, Pfizer Oncology. 24.01.2011).

6.2.3 Chemotherapie: Resistenz und Wirkungsverlust!

„Bisher hat sich kein Chemosensitivitätstest in der Routine für Krebspatienten bewährt“ (Krebsinformationsdienst, 2008).

In der Praxis könnte ein Chemosensitivitätstest der Frage, warum manche Tumoren nicht auf eine Therapie ansprechen, näher kommen. Dieser Problematik der individuellen Prüfung genetischer Eigenschaften von Tumoren vor und während einer zytostatischen Chemotherapie räumt die vorliegende Arbeit einen hohen Stellenwert ein. Sie verfolgt das Ziel, anhand der individuellen MDR1-Expression während einer Chemotherapie Rückschlüsse auf die Resistenzlage bzw. mögliche Resistenzentwicklung des Patienten zu ziehen, um einen CutOff-Wert für die Entstehung eines zeitnahen Wirkungsverlustes der Chemotherapie zu definieren. Diese Arbeit identifizierte Patienten, die eine „Multi-Drug“-Resistenz auf Grundlage der Follow-up MDR1-Expressionsdaten aus Blutzellen entwickelten.

Der Fokus dieser Resistenzstudie lag auf der Untersuchung des MDR1-Gens, da aus der Literatur hervorgeht, dass dieser ATP-abhängige ABC-Effluxtransporter maßgeblich an der Resistenzentwicklung beteiligt ist (Malayeri et al., 1996; Zuberová und Babusíková, 1998; Fojo et al., 1987), obwohl es dazu auch kontroverse Diskussionen gibt (Fisher und Sikic, 1995). In der Literatur sind einige Untersuchungen zur Analyse des MDR1-vermittelten resistenten Phänotyps durchgeführt worden. Hierbei kamen unterschiedliche Methoden in Form der hier verwendeten RT-PCR zum Einsatz (Kobayashi et al., 2000; Kato et al., 1994) sowie auch Northern Blot (Nooter und Sonneveld, 1994) und Durchflusszytometrie (Beck und Grogan, 1997; Pall et al., 1997), die größtenteils semiquantitative Ergebnisse lieferten. Unterschiedliche Vorgehensweisen und nicht-adäquate Labormethoden führten zu kontroversen Diskussionen. Für die Analyse in der vorliegenden Dissertation wurde eine quantitative real-time RT-PCR verwendet, da andere Studien vergleichend mit weiteren Methoden (Durchflusszytometrie und MTT Assay) zeigen konnten, dass die PCR die quantitativ sensitivste Methode für dieses Versuchsvorhaben darstellt (Fujimaki et al., 2002).

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass auch andere Effluxcarrier aus der Familie der ABC-Transporter, wie beispielsweise das dem MDR1 verwandte Protein MRP1, einen Medikamentenefflux aus Tumorzellen bewirken können (Conrad et al., 2002; Zhang et al., 2001). Weiterhin werden in der Literatur viele andere Resistenzmechanismen in Tumorzellen diskutiert (O'Connor, 2007; Malayeri et al., 1996).

Es konnten insgesamt 15 Hunde in die Studie aufgenommen werden, für die eine zum Teil sehr differierende Menge an Blutproben gewonnen wurde. Dies ist auf die unterschiedlich intensive Zusammenarbeit mit den Haustierärzten, welche die Chemotherapie oftmals selbst durchführten, und auf Therapieabbrüche zurückzuführen. Diese Umstände und Ausfälle während der Therapie waren im Voraus nicht kalkulierbar. Bei den 15 Patienten konnte bei vier eine Tumorprogression, bei einem eine partielle Remission, bei einem eine stabile Erkrankung und bei neun eine komplette Remission beobachtet werden.

In vorangegangenen Studien, die sich mit der Resistenzentstehung beschäftigt haben, wurden lediglich Biopsien zum Zeitpunkt der Tumorprogression entnommen. Dieses Vorgehen ist selbstverständlich darin begründet, dass eine Follow-up Expressionsanalyse aus Lymphknotengewebe nicht durchführbar ist, da ein wiederholtes Beprobieren der Lymphknoten notwendig wäre (Moore et al., 1995; Beck und Grogan, 1997). Um dieses Problem zu überwinden, verfolgte die vorliegende Studie die MDR1-Expressionslevel mit Hilfe von Blutproben. Diese konnten im Rahmen der Routinediagnostik vor jeder Chemotherapie gewonnen werden. Dieses Vorgehen erlaubte es, den zeitlichen Verlauf der MDR1-Expression während aller Therapiezyklen zu überwachen. Obwohl die MDR1-Expression niemals direkt aus Lymphknotengewebe bestimmt wurde, konnte diese Arbeit dennoch eine eindeutige Korrelation zwischen klinischer Progression und einem Anstieg des MDR1-Expressionslevels aus Blut herstellen. Im Gegensatz dazu verblieben Lymphompatienten mit gleichbleibenden MDR1-Expressionswerten während der Chemotherapie in kompletter Remission. Es muss jedoch auch erwähnt werden, dass zwei der 15 Patienten lediglich eine partielle Remission und stabilen Erkrankungsstatus erreichten. Es lässt sich hier die Hypothese aufstellen, dass die eingesetzten Zytostatika nicht ausreichend Tumorzellen zerstörten, um eine komplette Remission zu erreichen. Demnach muss die in den beiden Fällen vorliegende Therapieresistenz in einem MDR1 unabhängigen Mechanismus begründet sein (Gottesman et al., 2002).

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Ergebnisse lässt sich der genetische CutOff bei einem Anstieg der MDR1-Expression um den Faktor 2,0 definieren, der anhand klinischer Untersuchungen für diese Werte bestätigt werden kann. Hinsichtlich der Bestätigung dieser Ergebnisse sollte einerseits eine Untersuchung mit größerer Fallzahl und weiterhin Untersuchungen aus Gewebeproben angestrebt werden. Es ist weiterhin zu beachten, dass neben MDR1 auch andere Gene, wie beispielsweise MRP1, eine Resistenz vermitteln

können, sodass nachfolgende Untersuchungen sich die bereits etablierte Methode zu Nutze machen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, dass sowohl basale als auch follow-up MDR1-Expressionslevel als prognostische Faktoren für die Entstehung von Nebenwirkungen und die Entwicklung einer Therapieresistenz beim caninen Lymphom herangezogen werden können.

6.3 ZIELGERICHTETE KREBSTHERAPIE

“Dysfunction of tyrosine kinases occurs frequently in human cancers, and recent work indicates that a similar pattern of dysfunction will be observed in dog and cat cancers. [...] TKIs have only recently entered the arena of veterinary oncology, [...]” (Cheryl A London 2009).

Die zielgerichtete Krebstherapie, oder auch “Targeted Therapy” genannt, gewinnt in der Human- und Veterinär-onkologie eine immer größer werdende Bedeutung. Dies liegt einerseits darin begründet, dass die durch eine konventionelle Chemotherapie entstehenden Nebenwirkungen minimiert werden sollen; andererseits erfordert die Resistenzsituation einiger Patienten alternative Therapiestrategien.

Wie eingangs erläutert ist aus der Literatur bekannt, dass zahlreiche Arbeitsgruppen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wie Immunhistochemie (Webster et al., 2007), PCR (Webster et al., 2006; Riva et al., 2005), Fluoreszenz-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Jones et al., 2004) an der Identifizierung von cKIT in verschiedenen Tumorgeweben und dem Nachweis aktivierender Mutationen forschen. Dies zeigt ein großes Interesse seitens der Wissenschaft, das Indikationsgebiet für den Einsatz von TKIs auch auf andere Tumoren zu erweitern. Ebenso wie diese Studien, in denen der Beweis für den Einsatz von TKIs auf molekulargenetischer Ebene erbracht wurde, beschäftigt sich auch die vorliegende Arbeit mit der Identifizierung von aktivierenden Mutationen im cKIT-Gen verschiedener Tumoren (malignes Lymphom, Osteosarkom, Hämangiosarkom, Melanom) mit Hilfe einer PCR-Methode.

So wurden zu diesem Zweck 17 Hunde in die Studie aufgenommen, jedoch konnte nur bei zehn dieser Hunde eine full-length-Sequenz von cKIT generiert werden. Dies entspricht einem Prozentsatz von 41,2%, bei denen eine cKIT-Expression nicht nachgewiesen werden

konnte, und stimmt somit mit Angaben aus der Literatur überein: 48 % (Frost et al., 2003), 63 % (Gregory-Bryson et al., 2010), 40 % (Usher et al., 2009), die cKIT ebenfalls nicht in allen caninen Geweben nachweisen konnten. Dies macht deutlich, dass es bei der cKIT-Expression starke gewebliche Unterschiede gibt. cKIT wird beispielsweise nicht gleichermaßen in Tumoren des Darmes (u. a. GIST, Leiomyom, Leiomyosarkom) exprimiert (Lasota et al., 1999). Auch innerhalb von hämatopoietischen Tumoren, wie der Leukämie, gibt es starke Differenzen; so ist eine Expression bei der akuten myeloischen Leukämie zu 60 % und bei akuter lymphoblastischer Leukämie je nach Immunphänotyp nur zu weniger als drei bis neun Prozent wahrscheinlich (Sperling et al., 1997).

Unter den zehn Tumoren, für die cKIT mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte, befanden sich drei maligne Lymphome vom B-Zell-Typ, zwei Melanome, drei Osteosarkome und zwei Hämangiosarkome.

Wie bei der Polymorphismenanalyse bei MDR1 und MRP1 wurden auch bei cKIT mittels PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzanalyse SNPs identifiziert. Dabei konnten fünf silent SNPs und fünf mit einer Aminosäuresubstitution, die noch nicht aus der Literatur bekannt waren, nachgewiesen werden. Mit Hilfe der bioinformatischen Bewertungsprogramme, (1) PolyPhen und (2) SIFT, wurde ein Ranking der SNPs mit Aminosäuresubstitution nach Einfluss-Grad auf die Proteinfunktionalität durchgeführt.

(1) S772F, P456R, R23Q, G442D, Q192H

(2) S772F, P456R, R23Q, G442D, Q192H

Die Aminosäuresubstitution S772F, die heterozygot in einem Osteosarkom identifiziert wurde, konnte nach beiden Programmen als beeinflussend für die Proteinfunktion eingestuft werden, während nach SIFT die übrigen Substitutionen alle als „tolerated“ bewertet wurden. Es ist zudem zu bemerken, dass sich drei der Aminosäuresubstitutionen, G442D, P456R und S772F in Regionen befinden (Exon acht, neun, elf, 17), für die bereits ein gehäuftes Auftreten von aktivierenden Mutationen beschrieben wurde (Letard et al., 2008). Mit Hilfe des erstellten Rankings kann die vorliegende Arbeit zunächst nur eine Einschätzung über die Auswirkung auf die Proteinfunktion geben; es sind jedoch funktionelle Studien notwendig, um eine endgültige Aussage treffen zu können. Hierzu existieren in der Literatur bereits etablierte Zellmodelle wie beispielsweise Ba/F3 Zellen (murine Interleukin 3-abhängige B-Zell-Linie) (Warmuth et al., 2007; Letard et al., 2008). Die vorliegende Arbeit konnte auch eine bereits aus der Literatur bekannte Insertionsmutation, „GNSK“, an Position 512 in Exon neun identi-

fizieren. Diese wird in der Literatur kontrovers diskutiert. „GNSK“ wird als Deletion in der C2-Zelllinie beschrieben und dort zum einen als Splicevariante, da diese auch in der normalen Maus-cKIT-Sequenz vorhanden ist, und zum anderen als funktionell beeinflussend diskutiert, da für die C2-Zelllinie eine Autophosphorylierung in Abwesenheit von SCF nachgewiesen wurde (GenBank Accession Nos. AF0448148, AF099030) (London et al., 1999). Eine neuere Studie von 2003 hat sich der Identifizierung dieser zwei Isoformen (GNSK +; GNSK -) gewidmet. Sie beschreibt, dass die beiden Isoformen (GenBank Accession Nos. AY296484, AY313776) verschiedene cKIT-Proteine kodieren. Obwohl die in der humanen und murinen Sequenz identifizierte „Splicevariante“ (GNNK) der in Hund und in der C2-Zelllinie nachgewiesenen „Splicevariante“ (GNSK) sehr ähnlich ist, bestehen die Unterschiede an der dritten Position der Variante. Bei Mensch und Maus liegt ein Asparagin anstelle des Serins wie bei Hund und C2-Zellen vor (Tsai et al., 2003; Crosier et al., 1993). Zudem stellen andere Studien bezüglich der humanen und murinen Sequenz fest, dass die Isoformen in den meisten Geweben ko-exprimiert werden. Dies erklärt das Ergebnis in der vorliegenden Arbeit, dass „GNSK“ im Tumorgewebe (Hund 1b), nicht aber in Blutzellen (Hund 1a) nachgewiesen werden konnte. Von Reith et al. wurden die beiden Isoformen hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die GNNK-Isoform bei Maus und Mensch in COS-Zellen eine konstitutive Phosphorylierung mit Steigerung dieser unter SCF-Zugabe verursachte. Es wird vermutet, dass die beiden Isoformen einen unterschiedlichen Einfluss auf zytoplasmatische Signalproteine haben können (Reith et al., 1991). Wie bereits in der Untersuchung von Tsai et al. angedeutet, muss auch in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung dieser Splicevariante funktionell überprüft werden.

Neben den oben genannten Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene, einschließlich derer in der vorliegenden Arbeit, gibt es auch klinische Studien zu diesem Thema. Diese haben zum Ziel, während klinischer Untersuchungen das Anwendungsgebiet für TKIs bei anderen Tumoren zu erweitern, wenn andere Therapeutika versagen. Hierbei steht der klinische Therapieerfolg im Vordergrund. So gibt es in der Tierklinik Hofheim beispielsweise erste Erfolge beim Einsatz von Masivet bei linguale Plattenepithelkarzinomen der Katze; auch an der Ludwig-Maximilians-Universität München laufen bereits klinische Studien zur Applikation von TKIs bei kutanen Lymphomen, histiozytären Sarkomen und nicht-resezierbaren Mastzelltumoren (Grad II/III). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass TKIs in Kombinationsbe-

handlungen die zytotoxische Wirksamkeit einer Chemotherapie verstärken (Thamm et al., 2011).

Außerdem ist auch der Hersteller von Masivet, AB-Science, bestrebt, die Indikation für sein Produkt zu erweitern. Klinische Studien zur Evaluierung einer Therapie von Melanomen, T-Zell-Lymphomen, Hämangiosarkomen und Osteosarkomen bei Hunden sind vorgesehen. Andere wissenschaftliche Studien arbeiten ebenfalls mit Nachdruck an der Wirksamkeit von TKIs bei anderen Tumoren, wie dem caninen Osteosarkom (Croom und Perry, 2003; Liao et al., 2007), und versuchten den Einsatz von TKIs auch bei anderen Spezies, wie der Katze, zu etablieren (Katayama et al., 2004; Dank et al., 2002; Lachowicz et al., 2005).

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin konnten hierzu erste Erfolge verzeichnet werden, sodass bereits weitere TKIs, Palladia (Pryer et al., 2003), Sunitinib (Chow und Eckhardt, 2007) und Gefitinib (Ranson und Wardell, 2004) in der Entwicklung sind, um als alternative Präparate zur Verfügung zu stehen.

Sowohl die molekulargenetischen Untersuchungen als auch die Therapieerfolge aus klinischen Studien zeigen Potential, die TKIs in der Veterinärmedizin für ein breiteres Spektrum an Tumoren einzusetzen. Hierzu müssen jedoch weitere Studien durchgeführt werden, um aktivierende cKIT-Mutationen in einem größeren Patientenkollektiv, als den hier verwendeten 17 Patienten, zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Ferner darf nicht vergessen werden, dass auch andere Gene, wie PDGFRA (Usher et al., 2009; Heinrich et al., 2003), N-ras (Watzinger et al., 2001; Usher et al., 2009; Mayr et al., 2003) und FLT3 (Usher et al., 2009; Zavodovskaya et al., 2006) an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind und somit einen alternativen Weg zur Entstehung von Tumoren darstellen können.

7 Zusammenfassung

In der heutigen Zeit wird die Diagnose Krebs in der Kleintiermedizin immer häufiger aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung der Patienten gestellt. Im Zuge dieser Entwicklungen in der Veterinärmedizin rückt die klinische Onkologie mit dem Wunsch nach einer individualisierten und zielgerichteten Therapie in den Fokus der Wissenschaft. Als Modell für die Untersuchungen diente der vorliegenden Arbeit das maligne Lymphom des Hundes. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, einen entscheidenden Schritt zur weiteren Aufklärung zu liefern, inwieweit eine individualisierte Therapie beim Hund möglich ist und auch realisiert werden kann.

Hinsichtlich dieses Vorhabens beschäftigt sie sich einerseits mit der Korrelation von Nebenwirkungen nach einer Zytostatika-Applikation mit SNPs in den Efflux-Transportern MDR1 und MRP1 sowie einer veränderten MDR1-Expression. Andererseits fanden Untersuchungen statt, welche die Resistenzentwicklung während der Chemotherapie mittels Blutproben verfolgten und die Identifizierung eines CutOff-Wertes in der Hochregulation der MDR1-Expression bezüglich einer Resistenz anstrebten. Die Dissertation berichtet von der Existenz weiterer SNPs im MDR1- und MRP1-Gen, die jedoch noch funktionell zu charakterisieren sind. Bei Hunden mit gravierenden Nebenwirkungen konnten signifikant niedrigere MDR1-Expressionslevel ermittelt werden als bei Patienten mit guter Verträglichkeit der Chemotherapie. Aufgrund der Ergebnisse der Resistenzstudie lässt sich der genetische CutOff für die MDR1-Expression bei 2,0 definieren. Alle Hunde mit Werten über 2,0 entwickelten eine Therapieresistenz, während diejenigen mit Werten unter 2,0 in partieller oder kompletter Remission waren. Weiterhin widmet sich die Studie der „Targeted Therapy“ mit TKIs, die das Risiko für die Entstehung von Nebenwirkungen minimieren und als alternative Therapieoption für verschiedene Patienten zur Verfügung stehen. Im Hinblick auf die Identifizierung von SNPs und der Therapieerfolge aus klinischen Studien wird deutlich, dass TKIs in der Veterinärmedizin möglicherweise für ein breiteres Spektrum der Tumorbehandlung eingesetzt werden können.

Die Verwirklichung einer individualisierten und auch zielgerichteten Therapie für zum Teil sehr kleine Subpopulationen bleibt zwar mit einem hohen wissenschaftlichen und finanziel-

len Aufwand verbunden, kann aber eine wirksame und gut verträgliche Therapie für den einzelnen Patienten ermöglichen.

8 Summary

Today, cancer is frequently diagnosed in small animal medicine because of the patient's growing life span. Considering these developments in veterinary medicine, an individualized and targeted therapy in clinical oncology becomes more and more important. The work at hand uses the malignant lymphoma in dogs as a model for all experiments. It tries to report an important step towards an individualized therapy for dogs.

On the one hand, this study wants to correlate chemotherapeutic adverse effects with SNPs in ATP-dependent transporter genes, MDR1 and MRP1, as well as an aberrant MDR1-expression. On the other hand, we performed experiments to analyze the development of resistance during chemotherapy by using blood samples and tried to define a CutOff value for MDR1 upregulation determining resistance. The present work identified various SNPs in the MDR1 and MRP1 genes which still need to be functionally characterized. Moreover, this study showed that dogs with severe adverse effects had significantly lower MDR1 expression levels than dogs with which well-tolerated chemotherapy. Considering the results of the resistancy study, a genetic CutOff value of 2.0 for the upregulation of MDR1 could be defined. Dogs with values above 2.0 showed resistance to chemotherapy and dogs showing values lower 2.0 were in partial or complete remission. Furthermore, this thesis dealt with targeted therapy with TKIs by identifying SNPs in the cKIT gene. These drugs are supposed to minimize the risk of developing adverse effects which would serve as an alternative therapy for several patients. The identified SNPs in the cKIT gene as well as effective results from clinical studies point out that the TKI's potential could be useful in veterinary medicine to treat not only mast cell tumors but other tumors as well.

Realizing an individualized and targeted therapy for subpopulations is associated with high scientific and financial effort; but this type of therapy could initiate a more efficient and compatible treatment for individual patients.

9 Literaturverzeichnis

- Altuvia, S, Stein, WD, Goldenberg, S, Kane, SE, Pastan I, Gottesman, MM. 1993. "Targeted disruption of the mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression." *The Journal of Biological Chemistry* 268(36): 27127-27132.
- Ambudkar, S V, Dey, S, Hrycyna, CA, Ramachandra, M, Pastan I, Gottesman, MM. 1999. "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 361-398.
- Ando, T, M Nishimura, and Y Oka. 2000. "Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine) decreased DNA methylation and expression of MDR-1 gene in K562/ADM cells." *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 14(11): 1915-1920. Retrieved November 5, 2011.
- Anon. 1982. "National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project." *Cancer* 49(10): 2112-2135. Retrieved October 3, 2011.
- Anon. 2004. "Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0." *Veterinary and Comparative Oncology* 2(4): 195-213. Retrieved October 3, 2011.
- Baekgren, A W. 1965. "LYMPHATIC LEUKOSIS IN DOGS. AN EPIZOOTOLOGICAL, CLINICAL AND HAEMATOLOGICAL STUDY." *Acta Veterinaria Scandinavica* 6 Suppl 1: 1-80. Retrieved October 3, 2011.
- Bakos, E et al. 2000. "Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1)." *Journal of Cell Science* 113 Pt 24: 4451-4461. Retrieved May 20, 2012.
- Barbet, Joy L, Tara Snook, John M Gay, and Katrina L Mealey. 2009. "ABCB1-1 Delta (MDR1-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis." *Veterinary Dermatology* 20(2): 111-114. Retrieved October 3, 2011.
- Baskin, C R, C G Couto, and T E Wittum. 2000. "Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study." *Journal of the American Animal Hospital Association* 36(5): 404-409. Retrieved October 3, 2011.
- Beck, W T, and T M Grogan. 1997. "Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins." *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 11(7): 1107-1109. Retrieved November 6, 2011.

- Bell, R, S Cotter, A Lillquist, S Sallan, and R McCaffrey. 1984. "Characterization of glucocorticoid receptors in animal lymphoblastic disease: correlation with response to single-agent glucocorticoid treatment." *Blood* 63(2): 380-383. Retrieved October 13, 2011.
- Bellone, G, Silvestri, S, Artusio, E, Tibaudi, D, Turletti, E, Geuna, M, Giachino, C, Valente, G, Emanuelli, G, Rodeck, U. 1997. "Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the ckit receptor is inhibited by TGF-beta 1." *Journal of Cellular Physiology* 172(1): 1-11. Retrieved June 20, 2011.
- Bergman, P J, G K Ogilvie, and B E Powers. 1996. "Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10(6): 354-359. Retrieved October 3, 2011.
- Besmer, P, Murphy, J E, George, P C, Qiu, F S, Bergold, P J, Lederman, L, Snyder, H W Jr, Brodeur, D, Zuckerman, E E, Hardy, W, D. 1986. "A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family." *Nature* 320(6061): 415-421. Retrieved March 4, 2010.
- Bissonnette, Stéphane, Manon Paradis, Isabelle Daneau, and David W Silversides. 2009. "The ABCB1-1Delta mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis." *Veterinary Dermatology* 20(1): 60-66. Retrieved October 24, 2012.
- Boissan, M, F Feger, J J Guillosson, and M Arock. 2000. "c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases." *Journal of Leukocyte Biology* 67(2): 135-148. Retrieved March 3, 2010.
- Boyce, K L, and B E Kitchell. 2000. "Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP." *Journal of the American Animal Hospital Association* 36(5): 395-403. Retrieved November 4, 2011.
- Broudy, V C. 1997. "Stem cell factor and hematopoiesis." *Blood* 90(4): 1345-1364. Retrieved March 3, 2010.
- Buchholz, T A, Davis, D W, McConkey, D J, Symmans, W F, Valero, V, Jhingran, A, Tucker, S L, Pusztai, L, Cristofanilli, M, Estava, F J, Hortobagyi, M N, Sahin, A A. 2003. "Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy." *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 9(1): 33-41. Retrieved October 3, 2011.
- Budulac, S E, Postma D S, Hiemstra, P S, Kunz, L I, Siedlinski, M, Smit, H A, Vonk, J M, Rutgers, B, Timens, W, Boezen, H M. 2010. "Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) genetic variants, MRP1 protein levels and severity of COPD." *Respiratory Research* 11: 60. Retrieved October 3, 2011.
- Burger, H, Foekens, J A, Look, M P, Meijer-van Gelder, M E, Klijn, J G, Wiemer, E A, Stoter, G, Nooter, K. 2003. "RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic re-

- sponse." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9(2): 827-836. Retrieved November 5, 2011.
- Cascorbi, I. 2011. "P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations." *Handbook of Experimental Pharmacology* (201): 261-283. Retrieved October 3, 2011.
- Charney, Sarah C, Philip J Bergman, Ann E Hohenhaus, and Josephine A McKnight. 2003. "Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222(10): 1388-1393. Retrieved November 12, 2011.
- Choudhuri, Supratim, and Curtis D Klaassen. 2006. "Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters." *International Journal of Toxicology* 25(4): 231-259. Retrieved October 3, 2011.
- Chow, Laura Q M, and S Gail Eckhardt. 2007. "Sunitinib: from rational design to clinical efficacy." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(7): 884-896. Retrieved November 7, 2011.
- Chretien, J D, Rassnick, K M, Shaw, N A, Hahn, K A, Ogilvie, G K, Kristal, O, Northrup, N C, Moore, A S. 2007. "Prophylactic trimethoprim-sulfadiazine during chemotherapy in dogs with lymphoma and osteosarcoma: a double-blind, placebo-controlled study." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 21(1): 141-148. Retrieved October 3, 2011.
- Cohen, P S, J P Chan, M Lipkuns kaya, J L Biedler, and R C Seeger. 1994. "Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group." *Blood* 84(10): 3465-3472. Retrieved June 20, 2011.
- Conrad, S, Kauffmann, H M, Ito, K, Deeley, R G, Cole, S P, Schrenk, D. 2001. "Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution." *Journal of Human Genetics* 46(11): 656-663. Retrieved October 3, 2011.
- Conrad, S, Kauffmann, H M, Ito, K, Leslie, E M, Deeley, R G, Schrenk, D, Cole, S P. 2002. "A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance." *Pharmacogenetics* 12(4): 321-330. Retrieved October 3, 2011.
- Conseil, Gwenaëlle, Roger G Deeley, and Susan P C Cole. 2005. "Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters." *Pharmacogenetics and Genomics* 15(8): 523-533. Retrieved October 3, 2011.
- Cordon-Cardo, C, O'Brien, J P, Boccia, J, Casals, D, Bertino, J R, Melamed, M R. 1990. "Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 38(9): 1277-1287. Retrieved October 3, 2011.

- Croom, Katherine F, and Caroline M Perry. 2003. "Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours." *Drugs* 63(5): 513-522; discussion 523-524. Retrieved November 7, 2011.
- Crosier, P S, Ricciardi, S T, Hall, L R, Vitas, M R, Clark, S C, Crosier, K E. 1993. "Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia." *Blood* 82(4): 1151-1158. Retrieved November 12, 2011.
- Culmsee, K, A D Gruber, G von Samson-Himmelstjerna, and I Nolte. 2004. "Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction." *Research in Veterinary Science* 77(3): 223-229. Retrieved June 4, 2011.
- Dank, Gillian, May B Chien, and Cheryl A London. 2002. "Activating mutations in the catalytic or juxtamembrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats." *American Journal of Veterinary Research* 63(8): 1129-1133. Retrieved November 7, 2011.
- Dorn, C R, D O Taylor, and H H Hibbard. 1967. "Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma." *American Journal of Veterinary Research* 28(125): 993-1001. Retrieved October 3, 2011.
- Drescher, S, Schaeffeler, E, Hitzl, M, Hofmann, U, Schwab, M, Brinkmann, U, Eichelbaum, M, Fromm, M F. 2002. "MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine." *British Journal of Clinical Pharmacology* 53(5): 526-534. Retrieved October 3, 2011.
- Efferth, T, B W Futscher, and R Osieka. 2001. "5-Azacytidine modulates the response of sensitive and multidrug-resistant K562 leukemic cells to cytostatic drugs." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 27(3): 637-648. Retrieved November 5, 2011.
- Ettinger, S N. 2003. "Principles of treatment for canine lymphoma." *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18(2): 92-97. Retrieved November 4, 2011.
- Fantl, W J, D E Johnson, and L T Williams. 1993. "Signalling by receptor tyrosine kinases." *Annual Review of Biochemistry* 62: 453-481. Retrieved June 20, 2011.
- Fellay, J, Marzolini, C, Meaden, E R, Back, D J, Buclin, T, Chave, J P, Decosterd, L A, Furrer, H, Opravil, M, Pantaleo, G, Retelska, D, Ruiz, L, Schinkel, A H, Vernazza, P, Eap, C B, Telenti, A. 2002. "Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study." *Lancet* 359(9300): 30-36. Retrieved October 3, 2011.
- Ferrell, Betty, Judith Paice, and Marianna Koczywas. 2008. "New standards and implications for improving the quality of supportive oncology practice." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(23): 3824-3831. Retrieved October 3, 2011.
- Fisher, G A, and B I Sikic. 1995. "Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 9(2): xi-xii. Retrieved November 6, 2011.

- Flory, A B, Rassnick, K M, Al-Sarraf, R, Bailey, D Balkman, C E, Kiselow, M A, Autio, K. 2008. "Combination of CCNU and DTIC chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 22(1): 164-171. Retrieved October 3, 2011.
- Fojo, A T, Ueda, K, Slamon, D J, Poplack, D G, Gottesman, M M, Pastan, I. 1987. "Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(1): 265-269. Retrieved November 6, 2011.
- Franklin, H R, Simonetti, G P, Dubbelman, A C, ten Bokkel Huinink, W W, Taal, B G, Wigbout, G, Mandjes, I A, Dalesio, O B, Aaronson, N K. 1994. "Toxicity grading systems. A comparison between the WHO scoring system and the Common Toxicity Criteria when used for nausea and vomiting." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 5(2): 113-117. Retrieved October 3, 2011.
- Fromm, M F. 2004. "Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers." *Trends in Pharmacological Sciences* 25(8): 423-429. Retrieved March 28, 2011.
- Fromm, M F. 2002. "The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans." *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(10): 1295-1310. Retrieved October 1, 2011.
- Frost, D, J Lasota, and M Miettinen. 2003. "Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases." *Veterinary Pathology* 40(1): 42-54. Retrieved November 7, 2011.
- Fujimaki, Shin-ichi, Funato, T, Harigae, H, Fujiwara, J, Kameoka, J, Meguro, K, Kaku, M, Sasaki, K. 2002. "Quantitative analysis of a MDR1 transcript for prediction of drug resistance in acute leukemia." *Clinical Chemistry* 48(6 Pt 1): 811-817. Retrieved October 3, 2011.
- Fukushima-Uesaka, H, Saito, Y, Tohkin, M, Maekawa, K, Hasegawa, R, Kawamoto, M, Kamatani, M, Suzuki, K, Yanagawa, K, Kajio, H, Kuzuya, N, Yasuda, K, Sawada, J. 2007. "Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene ABCC1 in a Japanese population." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 22(1): 48-60. Retrieved October 3, 2011.
- Geyer, J, Döring, B, Godoy, J R, Leidolf, R, Moritz, A, Petzinger, E. 2005. "Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28(6): 545-551. Retrieved March 28, 2011.
- Geyer, Joachim, and Christina Janko. 2012. "Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(6): 969-986. Retrieved October 24, 2012.
- Ginn, P E. 1996. "Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues." *Veterinary Pathology* 33(5): 533-541. Retrieved March 2, 2010.

- Gleixner, K V, Rebuzzi, L, Mayerhofer, M, Gruze, A, Hadzijusufovic, E, Sonneck, K, Vales, A, Kneidinger, M, Samoorapompichit, P, Thaiwong, T, Pickl, W F, Yuzbasiyan-Gurkan, V, Sillaber, C, Valent, P. 2007. "Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells." *Experimental Hematology* 35(10): 1510-1521. Retrieved March 3, 2010.
- Gottesman, Michael M, Tito Fojo, and Susan E Bates. 2002b. "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nature Reviews. Cancer* 2(1): 48-58. Retrieved October 3, 2011.
- Gramer, I, Leidolf, R, Döring, B, Klintzsch, S, Krämer, E M, Yalcin, E, Petzinger, E, Geyer, J. 2011. "Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs." *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 189(1): 67-71. Retrieved October 3, 2011.
- Greenlee, P G, Filippa, D A, Quimby, F W, Patnaik, A K, Calvano, S E, Matus, R E, Kimmel, M, Hurvitz, A I, Lieberman, P H. 1990. "Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study." *Cancer* 66(3): 480-490. Retrieved October 3, 2011.
- Gregory-Bryson, Emmalena, Elizabeth Bartlett, Matti Kiupel, Schantel Hayes, and Vilma Yuzbasiyan-Gurkan. 2010. "Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11." *BMC Cancer* 10: 559. Retrieved October 13, 2011.
- Han, Jae-Ik, Hyoung-Won Son, Seung-Cheol Park, and Ki-Jeong Na. 2010. "Novel insertion mutation of ABCB1 gene in an ivermectin-sensitive Border Collie." *Journal of Veterinary Science* 11(4): 341-344. Retrieved October 3, 2011.
- Heading, K L, L K Brockley, and P F Bennett. 2011. "CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002-07)." *Australian Veterinary Journal* 89(4): 109-116. Retrieved October 3, 2011.
- Heinrich, M C, Corless, C L, Duensing, A, McGreevey, L, Chen, C J, Joseph, N, Singer, S, Griffith, D J, Haley, A, Town, A, Demetri, G D, Fletcher, C D, Fletcher, J A. 2003. "PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Science (New York, N.Y.)* 299(5607): 708-710. Retrieved November 7, 2011.
- Hoffmeyer, S, Burk, O, von Richter, O, Arnold, H P, Brockmöller, J, John, A, Cascorbi, I, Gerloff, T, Roots, I, Eichelbaum, M, Brinkmann, U. 2000. "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7): 3473-3478. Retrieved October 3, 2011.
- Hosoya, K, Kisseberth, W C, Lord, L K, Alvarez, F J, Lara-Garcia, A, Kosarek, C E, London, C A, Couto, C G. 2007. "Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 21(6): 1355-1363. Retrieved October 3, 2011.
- Jagielski, D, R Lechowski, M Hoffmann-Jagielska, and S Winiarczyk. 2002. "A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs

- (1998-2000).” *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 49(8): 419-424. Retrieved October 3, 2011.
- Jones, Cameron L R, Robert A Grahn, May B Chien, Leslie A Lyons, and Cheryl A London. 2004. “Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 16(2): 95-100. Retrieved March 3, 2010.
- Juliano, R L, and V Ling. 1976. “A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 455(1): 152-162. Retrieved October 3, 2011.
- Kaplan, H S. 1974. “Leukemia and lymphoma in experimental and domestic animals.” *Series Haematologica* 7(2): 94-163. Retrieved October 3, 2011.
- Katayama, R, Huelsmeyer, M K, Marr, A K, Kurzman, I D, Thamm, D H, Vail, D M. 2004. “Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 54(1): 25-33. Retrieved November 7, 2011.
- Kato, S, Ideguchi, H, Futata, Y, Hamasaki, N, Umemura, T, Nishimura, T. 1994. “Analysis of *mdr-1* gene expression in human leukemic cells by quantitative competitive PCR.” *Leukemia & Lymphoma* 14(1-2): 129-135. Retrieved November 6, 2011.
- Keller, E T, E G MacEwen, R C Rosenthal, S C Helfand, and L E Fox. 1993. “Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma.” *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 7(5): 289-295. Retrieved October 3, 2011.
- Kemmer, K, Corless, C L, Fletcher, J A, McGreevey, L, Haley, A, Griffith, D, Cummings, O W, Wait, C, Town, A, Heinrich, M C. 2004. “KIT mutations are common in testicular seminomas.” *The American Journal of Pathology* 164(1): 305-313. Retrieved November 12, 2011.
- Kerb, R. 2006. “Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy.” *Cancer Letters* 234(1): 4-33. Retrieved October 3, 2011.
- Kessler, M. 2005. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*. 2nd ed. Parey Bei Mvs.
- Kim, R B, Leake, B F, Choo, E F, Dresser, G K, Kubba, S V, Schwarz, U I, Taylor, A, Xie, H G, McKinsey, J, Zhou, S, Lan, L B, Schuetz, J D, Schuetz, E G, Wilkinson, G R. 2001. “Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 70(2): 189-199. Retrieved October 3, 2011.
- Kinslow, Carla J, Randa A El-Zein, Courtney E Hill, Jeffrey K Wickliffe, and Sherif Z Abdel-Rahman. 2008. “Single nucleotide polymorphisms 5’ upstream the coding region of

- the NEIL2 gene influence gene transcription levels and alter levels of genetic damage." *Genes, Chromosomes & Cancer* 47(11): 923-932. Retrieved November 5, 2011.
- Kitayama, H, Kanakura, Y, Furitsu, T, Tsujimura, T, Oritani, K, Ikeda, H, Sugahara, H, Mitsui, H, Kanayama, Y, Kitamura, Y. 1995. "Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines." *Blood* 85(3): 790-798. Retrieved March 3, 2010.
- Kiupel, M, E Teske, and D Bostock. 1999. "Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma." *Veterinary Pathology* 36(4): 292-300. Retrieved October 3, 2011.
- Kobayashi, H, Takemura, Y, Kawai, Y, Miyachi, H, Kawabata, M, Matsumura, M, Yamashita, T, Mori, S, Furihata, K, Shimodaira, S, Motoyoshi, K, Hotta, T, Sekiuchi, S, Ando, Y, Watanabe, K. 2000. "Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay for quantification of human multidrug resistance 1 (MDR1) gene expression in fresh leukemic cells." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 135(2): 199-209. Retrieved November 6, 2011.
- Kourti, M, Vavatsi, N, Gombakis, N, Sidi, V, Tzimagiorgis, G, Papageorgiou, T, Koliouskas, D, Athanassiadou, F. 2007. "Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia." *International Journal of Hematology* 86(2): 166-173. Retrieved November 5, 2011.
- Kroetz, D L, Pauli-Magnus, C, Hodges, L M, Huang, C C, Kawamoto, M, Johns, S J, Stryke, D, Ferrin ; T E, DeYoung, J, Taylor, T, Carlson, E J, Herskowitz, I, Giacomini, K M, Clark, A G. 2003. "Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene." *Pharmacogenetics* 13(8): 481-494. Retrieved October 3, 2011.
- Krugman, L, J N Bryan, K L Mealey, and A Chen. 2012. "Vincristine-induced central neurotoxicity in a collie homozygous for the ABCB1 Δ mutation." *The Journal of Small Animal Practice* 53(3): 185-187. Retrieved October 24, 2012.
- Krystal, G W, S J Hines, and C P Organ. 1996. "Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor." *Cancer Research* 56(2): 370-376. Retrieved June 20, 2011.
- Lachowicz, Joshua L, Gerald S Post, and Edwin Brodsky. 2005. "A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 19(6): 860-864. Retrieved November 7, 2011.
- Lang, T, Hitzl, M, Burk, O, Mornhinweg, E, Keil, A, Kerb, R, Klein, K, Zanger, U M, Eichelbaum, M, Fromm, M F.. 2004. "Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver." *Pharmacogenetics* 14(3): 155-164. Retrieved October 3, 2011.

- Lasota, J, M Jasinski, M Sarlomo-Rikala, and M Miettinen. 1999. "Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas." *The American Journal of Pathology* 154(1): 53-60. Retrieved November 7, 2011.
- Lee, J J, C S Hughes, R L Fine, and R L Page. 1996. "P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance." *Cancer* 77(9): 1892-1898. Retrieved June 4, 2011.
- Legha, S S. 1986. "Vincristine neurotoxicity. Pathophysiology and management." *Medical Toxicology* 1(6): 421-427. Retrieved November 6, 2011.
- Lennert, K, H Stein, and E Kaiserling. 1975. "Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata." *The British Journal of Cancer. Supplement* 2: 29-43. Retrieved October 3, 2011.
- Letard, S, Yang, Y, Hanssens, K, Palmérini, F, Leventhal, P S, Guéry, S, Moussy, A, Kinet, J P, Hermine, O, Dubreuil, P. 2008. "Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors." *Molecular Cancer Research: MCR* 6(7): 1137-1145. Retrieved March 3, 2010.
- Liao, A T, J McCleese, S Kamerling, J Christensen, and C A London. 2007. "A novel small molecule Met inhibitor, PF2362376, exhibits biological activity against osteosarcoma." *Veterinary and Comparative Oncology* 5(3): 177-196. Retrieved November 7, 2011.
- Lieberman, P H, Filippa, D A, Straus, D J, Thaler, H T, Cirrincione, C, Clarkson, B D. 1986. "Evaluation of malignant lymphomas using three classifications and the working formulation. 482 cases with median follow-up of 11.9 years." *The American Journal of Medicine* 81(3): 365-380. Retrieved October 3, 2011.
- Liu, Lijuan, Lan Fan, Xiangdong Peng, Dongli Hu, and Honghao Zhou. 2010. "MDR1 C2005T polymorphism changes substrate specificity." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 66(3): 617-623. Retrieved October 3, 2011.
- Logan, Julie, Kirstin Edwards, and Nick Saunders. 2009. *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. 1st ed. Caister Academic Press.
- London, C A, Galli, S J, Yuuki, T, Hum Z Q, Helfand, S C, Geisler, E N. 1999. "Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit." *Experimental Hematology* 27(4): 689-697. Retrieved March 3, 2010.
- London, C A. 2009. "Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine." *Topics in Companion Animal Medicine* 24(3): 106-112. Retrieved November 7, 2011.
- Loo, T W, and D M Clarke. 1993. "Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein." *The Journal of Biological Chemistry* 268(5): 3143-3149. Retrieved October 1, 2011.

- Lorenzo, F, Nishii, K, Monma, F, Kuwagata, S, Usui, E, Shiku, H. 2006. "Mutational analysis of the KIT gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia." *Leukemia Research* 30(10): 1235-1239. Retrieved March 3, 2010.
- Lukes, R J, Parker, J W, Taylor, C R, Tindle, B H, Cramer, A D, Lincoln, T L. 1978. "Immunologic approach to non-Hodgkin lymphomas and related leukemias. Analysis of the results of multiparameter studies of 425 cases." *Seminars in Hematology* 15(4): 322-351. Retrieved October 3, 2011.
- Luqmani, Y A. 2005. "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy." *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 14 Suppl 1: 35-48. Retrieved October 3, 2011.
- Ma, L, Pratt, S E, Cao, J, Dantzig, A H, Moore, R H, Slapak, C H. 2002. "Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein." *Molecular Cancer Therapeutics* 1(14): 1335-1342. Retrieved October 3, 2011.
- Ma, Y, Longley, B J, Wang, X, Blount, J L, Langley, K, Caughey, G H. 1999. "Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms." *The Journal of Investigative Dermatology* 112(2): 165-170. Retrieved March 3, 2010.
- MacEwen, E G, N O Brown, A K Patnaik, A A Hayes, and S Passe. 1981. "Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 178(11): 1178-1181. Retrieved October 3, 2011.
- Macdonald, Neil, and Alex Gledhill. 2007. "Potential impact of ABCB1 (p-glycoprotein) polymorphisms on avermectin toxicity in humans." *Archives of Toxicology* 81(8): 553-563. Retrieved October 3, 2011.
- Mahjoubi, F, S Akbari, M Montazeri, and F Moshryi. 2008. "MRP1 polymorphisms (T2684C, C2007T, C2012T, and C2665T) are not associated with multidrug resistance in leukemic patients." *Genetics and Molecular Research: GMR* 7(4): 1369-1374. Retrieved October 3, 2011.
- Malayeri, R, Filipits, M, Suchomel, R W, Zöchbauer, S, Lechner, K, Pirker, R. 1996. "Multidrug resistance in leukemias and its reversal." *Leukemia & Lymphoma* 23(5-6): 451-458. Retrieved November 6, 2011.
- Marin, M P, R J Samson, and E R Jackson. 1996. "Hemorrhagic cystitis in a dog." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 37(4): 240. Retrieved November 12, 2011.
- Martinez, M, Modric, S, Sharkey, M, Troutman, L, Walker, L, Mealey, K. 2008. "The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31(4): 285-300. Retrieved March 28, 2011.
- Mayr, B, M Holzheu, G Schaffner, and M Reifinger. 2003. "N-ras mutation in a canine lymphoma: short communication." *Acta Veterinaria Hungarica* 51(1): 91-94. Retrieved November 7, 2011.

- Mealey, K L, S A Bentjen, J M Gay, and G H Cantor. 2001b. "Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene." *Pharmacogenetics* 11(8): 727-733. Retrieved October 3, 2011.
- Mealey, K L, Fidel, J, Gay, J M, Impellizeri, J A, Clifford, C A, Bergman, P J. 2008. "ABCB1-1Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 22(4): 996-1000. Retrieved October 3, 2011.
- Mealey, Katrina L, Nicole C Northrup, and Steven A Bentjen. 2003. "Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223(10): 1453-1455, 1434. Retrieved October 24, 2012.
- Mellanby, R J, M E Herrtage, and J M Dobson. 2003. "Owners' assessments of their dog's quality of life during palliative chemotherapy for lymphoma." *The Journal of Small Animal Practice* 44(3): 100-103. Retrieved November 4, 2011.
- Miller, A B, B Hoogstraten, M Staquet, and A Winkler. 1981. "Reporting results of cancer treatment." *Cancer* 47(1): 207-214. Retrieved October 3, 2011.
- Miller, T P, Grogan, T M, Dalton, W S, Spier, C M, Scheper, R J, Salmon, S E. 1991. "P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 9(1): 17-24. Retrieved October 24, 2012.
- Miyoshi, N, Tojo, E, Oishi, A, Fujiki, M, Misumi, K, Sakamoto, H, Kameyama, K, Shimizu, T, Yasuda, N. 2002. "Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 64(6): 531-533. Retrieved March 2, 2010.
- Moen, Marit D, Kate McKeage, Greg L Plosker, and M Asif A Siddiqui. 2007. "Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia." *Drugs* 67(2): 299-320. Retrieved June 20, 2011.
- Moore, A S, C R Leveille, K A Reimann, H Shu, and I M Arias. 1995. "The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance." *Cancer Investigation* 13(5): 475-479. Retrieved October 3, 2011.
- Moscow, J A, and K H Dixon. 1993. "Glutathione-related enzymes, glutathione and multidrug resistance." *Cytotechnology* 12(1-3): 155-170. Retrieved October 3, 2011.
- Mueller, R S, and S V Bettenay. 1999. "A proposed new therapeutic protocol for the treatment of canine mange with ivermectin." *Journal of the American Animal Hospital Association* 35(1): 77-80. Retrieved October 24, 2012.
- Murken, Jan, Tiemo Grimm, and Elke Holinski-Feder. 2006. *Humangenetik*. 7th ed. Thieme, Stuttgart.

- Neff, M W, Robertson, K R, Wong, A K, Safra, N; Broman, K W, Slatkin, M, Mealey, K L, Peder-
sen, N C. 2004. "Breed distribution and history of canine mdr1-1Delta, a pharmaco-
genetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage." *Pro-
ceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
101(32): 11725-11730. Retrieved March 4, 2010.
- Neiger, R. 2009. *Differenzialdiagnosen Innere Medizin bei Hund und Katze: Vom Leitsymptom
zur Diagnose*. 1st ed. Enke.
- Ng, P C, and S Henikoff. 2001. "Predicting deleterious amino acid substitutions." *Genome
Research* 11(5): 863-874. Retrieved October 15, 2011.
- Ng, Pauline C, and Steven Henikoff. 2003. "SIFT: Predicting amino acid changes that affect
protein function." *Nucleic Acids Research* 31(13): 3812-3814. Retrieved October 15,
2011.
- Nooter, K, and P Sonneveld. 1994. "Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haema-
tological malignancies." *Leukemia Research* 18(4): 233-243. Retrieved November 6,
2011.
- Northrup, N C, Rassnick, K M, Snyder, L A, Stone, M S, Kristal, O, Cotter, S M, Moore A S.
2002. "Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginase induction chemo-
therapy for canine lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American
College of Veterinary Internal Medicine* 16(5): 570-575. Retrieved October 3, 2011.
- Owen, L. N. 1980. "TNM classification of tumours in domestic animals." *TNM classification of
tumours in domestic animals*.
- O'Connor, Robert. 2007. "The pharmacology of cancer resistance." *Anticancer Research*
27(3A): 1267-1272. Retrieved October 3, 2011.
- Pall, G, M Spitaler, J Hofmann, J Thaler, and C Ludescher. 1997. "Multidrug resistance in
acute leukemia: a comparison of different diagnostic methods." *Leukemia: Official
Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 11(7):
1067-1072. Retrieved November 6, 2011.
- Parodi, A, M Wyers, and J Paris. 1968. "Incidence of canine lymphoid leukosis. Age, sex and
breed distribution; results of a necropsic survey." *Bibliotheca Haematologica* 30: 263-
267. Retrieved October 3, 2011.
- Pryer, N K, Lee, L B, Zadovaskaya, R, Yu, X, Sukbuntherng, J, Cherrington, J M, London, C A.
2003. "Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast
cell tumors." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association
for Cancer Research* 9(15): 5729-5734. Retrieved November 7, 2011.
- Pytel, Dariusz, Tomasz Sliwinski, Tomasz Poplawski, Deborah Ferriola, and Ireneusz Majst-
erek. 2009. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." *Anti-
Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9(1): 66-76. Retrieved October 13, 2011.

- Ranson, M, and S Wardell. 2004. "Gefitinib, a novel, orally administered agent for the treatment of cancer." *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 29(2): 95-103. Retrieved November 7, 2011.
- Rassnick, K M, Mauldin, G E, Al-Sarraf, R, Mauldin, G N, Moore, A S, Mooney, S C. 2002. "MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000)." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16(5): 576-580. Retrieved October 3, 2011.
- Reith, A D, Ellis, C, Lyman, S D, Anderson, D M, Williams, D E, Bernstein, A, Pawson, T. 1991. "Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase." *The EMBO Journal* 10(9): 2451-2459. Retrieved November 12, 2011.
- Richardson, Gillian, and Roxanne Dobish. 2007. "Chemotherapy induced diarrhea." *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* 13(4): 181-198. Retrieved October 13, 2011.
- Riva, Federica, Stefano Brizzola, Damiano Stefanello, Simone Crema, and Lauretta Turin. 2005. "A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 17(4): 385-388. Retrieved March 3, 2010.
- Rochat, B. 2009. "Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents." *Current Cancer Drug Targets* 9(5): 652-674. Retrieved October 3, 2011.
- Roskoski, R. 2005. "Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(3): 1307-1315. Retrieved March 3, 2010.
- Sakurai, A, Onishi, Y, Hirano, H, Seigneuret, M, Obabayama, K, Kim, G, Liew, E L, Sakaeda, T, Yoshiura, K, Niikawa, N, Sakurai, M, Ishikawa, T. 2007. "Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1)." *Biochemistry* 46(26): 7678-7693. Retrieved October 24, 2012.
- Sauna, Zuben E, Chava Kimchi-Sarfaty, Suresh V Ambudkar, and Michael M Gottesman. 2007. "Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer." *Cancer Research* 67(20): 9609-9612. Retrieved October 3, 2011.
- Schinkel. 1999. "P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier." *Advanced Drug Delivery Reviews* 36(2-3): 179-194. Retrieved October 3, 2011.
- Schold, S C, Jr, Brent, T P, von Hofe, E, Friedman, H S, Mitra, S, Bigner, D D, Swenberg, J A, Kleihues, P. 1989. "O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and sensitivity to procarbazine in human brain-tumor xenografts." *Journal of Neurosurgery* 70(4): 573-577. Retrieved October 3, 2011.

- Seward, R L. 1983. "Reactions in dogs given ivermectin." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183(5): 493. Retrieved March 28, 2011.
- Sharma, Rohini, Peter Tobin, and Stephen J Clarke. 2005. "Management of chemotherapy-induced nausea, vomiting, oral mucositis, and diarrhoea." *The Lancet Oncology* 6(2): 93-102. Retrieved October 28, 2011.
- Silver, Nicholas, Steve Best, Jie Jiang, and Swee Lay Thein. 2006. "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *BMC Molecular Biology* 7: 33. Retrieved November 5, 2011.
- Sperling, C, S Schwartz, T Büchner, E Thiel, and W D Ludwig. 1997. "Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias." *Haematologica* 82(5): 617-621. Retrieved November 7, 2011.
- Squire, R A, M Bush, E C Melby, L M Neeley, and B Yarbrough. 1973. "Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification, and therapy." *Journal of the National Cancer Institute* 51(2): 565-574. Retrieved October 3, 2011.
- Teske, E. 1994. "Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma." *The Veterinary Quarterly* 16(4): 209-219. Retrieved October 3, 2011.
- Teske, E, P Wisman, P F Moore, and P van Heerde. 1994. "Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology." *Experimental Hematology* 22(12): 1179-1187. Retrieved October 3, 2011.
- Thamm, D H, Rose, B, Kow, K, Humbert, M, Mansfield, C D, Moussy, A, Hermine, O, Dubreuil, E. 2011. "Masitinib as a chemosensitizer of canine tumor cell lines: A proof of concept study." *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. Retrieved November 12, 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333567>).
- Thamm, Douglas H, and David M Vail. 2007. "Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects." *Journal of the American Animal Hospital Association* 43(1): 1-7. Retrieved October 13, 2011.
- Therasse, P, Arbuck, S G, Eisenhauer, E A, Wanders, J, Kaplan, R S, Rubinstein, L, Verweij, J, Van Glabbeke, M, van Oosterom, A M, Christian, M C, Gwyther, S G. 2000. "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." *Journal of the National Cancer Institute* 92(3): 205-216. Retrieved October 3, 2011.
- Thiebaut, F, Tsuruo, T, Hamada, H, Gottesman, M M, Pastan, I, Willingham, M C. 1987. "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21): 7735-7738. Retrieved October 3, 2011.

- Tomiyasu, H, Goto-Koshino Y, Takahashi, M, Fujino, Y, Ohno, K, Tsujimoto, H. 2010. "Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 72(9): 1165-1172. Retrieved June 4, 2011.
- Tomiyasu, Hirotaka, Masashi Takahashi, Yasuhito Fujino, Koichi Ohno, and Hajime Tsujimoto. 2010. "Gastrointestinal and hematologic adverse events after administration of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma that underwent a combination multidrug chemotherapy protocol." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 72(11): 1391-1397. Retrieved October 3, 2011.
- Tsai, K L, R Guyon, and K E Murphy. 2003. "Identification of isoforms and RH mapping of canine KIT." *Cytogenetic and Genome Research* 102(1-4): 261-263. Retrieved November 12, 2011.
- Umbenhauer, D R, Lankas, G R, Pippert, T R, Wise, L D, Cartwright, M E, Hall, S J, Beare, C M. 1997. "Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism." *Toxicology and Applied Pharmacology* 146(1): 88-94. Retrieved October 3, 2011.
- Usher, Suzanne G, Alan D Radford, Elizabeth J Villiers, and Laura Blackwood. 2009. "RAS, FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias." *Experimental Hematology* 37(1): 65-77. Retrieved November 7, 2011.
- Vail, D M. 2009. "Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: neutropenia and gastrointestinal toxicity." *Topics in Companion Animal Medicine* 24(3): 122-129. Retrieved October 13, 2011.
- Valerius, K D, G K Ogilvie, C H Mallinckrodt, and D M Getzy. 1997. "Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210(4): 512-516. Retrieved October 3, 2011.
- Valli, V E, Jacobs, R M, Parodi, A L, Vernau, W, Moore, P F. 2002. "Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals." *Published by the Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Second Series Volume VIII*, 2002.
- Walji, N, A K Chan, and D R Peake. 2008. "Common acute oncological emergencies: diagnosis, investigation and management." *Postgraduate Medical Journal* 84(994): 418-427. Retrieved October 28, 2011.
- Wang, Lin-Lin, Ya-He Liu, Lu-Lu Meng, Chun Guang Li, and Shu-Feng Zhou. 2011. "Phenotype prediction of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms in human ATP-binding cassette transporter genes." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 108(2): 94-114. Retrieved October 15, 2011.

- Warmuth, Markus, Sungjoon Kim, Xiang-ju Gu, Gang Xia, and Francisco Adrián. 2007. "Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery." *Current Opinion in Oncology* 19(1): 55-60. Retrieved November 12, 2011.
- Watzinger, F, B Mayr, R Gamerith, C Vetter, and T Lion. 2001. "Comparative analysis of ras proto-oncogene mutations in selected mammalian tumors." *Molecular Carcinogenesis* 30(4): 190-198. Retrieved November 7, 2011.
- Webster, J D, M Kiupel, J B Kaneene, R Miller, and V Yuzbasiyan-Gurkan. 2004. "The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors." *Veterinary Pathology* 41(4): 371-377. Retrieved June 20, 2011.
- Webster, J D, V Yuzbasiyan-Gurkan, R A Miller, J B Kaneene, and M Kiupel. 2007. "Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication." *Veterinary Pathology* 44(3): 298-308. Retrieved March 3, 2010.
- Webster, J D, Yuzbasiyan-Gurkan, V, Kaneene, J B, Miller, R, Resau, J H, Kiupel, M. 2006. "The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 8(2): 104-111. Retrieved March 3, 2010.
- Wu, Chung-Pu, Chia-Hung Hsieh, and Yu-Shan Wu. 2011. "The Emergence of Drug Transporter-Mediated Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy." *Molecular Pharmaceutics*. Retrieved October 3, 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21770407>).
- Yin, J Y, Huang, Q, Yang, Y, Zhang, J T, Zhong, M Z, Zhou, H H, Liu, Z Q. 2009. "Characterization and analyses of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphisms in Chinese population." *Pharmacogenetics and Genomics* 19(3): 206-216. Retrieved October 3, 2011.
- Zavodovskaya, R, Liao, T, Jones, C L, Yip, B, Chien, B, Moore, P F, London, C A. 2006. "Evaluation of dysregulation of the receptor tyrosine kinases Kit, Flt3, and Met in histiocytic sarcomas of dogs." *American Journal of Veterinary Research* 67(4): 633-641. Retrieved November 7, 2011.
- Zemann, B I, Moore, A S, Rand, W M, Mason, G, Ruslander, D M, Frimberger, A E, Wood, C A, L'Heureux, D A, Gliatto, J, Cotter, S M. 1998. "A combination chemotherapy protocol (VELCAP-L) for dogs with lymphoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 12(6): 465-470. Retrieved November 4, 2011.
- Zhang, D W, S P Cole, and R G Deeley. 2001. "Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines." *The Journal of Biological Chemistry* 276(16): 13231-13239. Retrieved October 3, 2011.
- Zhang, Xiaozhu, Lily Ding, and Andrew J Sandford. 2005. "Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR." *BMC Molecular Biology* 6(1): 4. Retrieved November 5, 2011.

Zubercová, O, and O Babusíková. 1998. "The multidrug resistance in human leukemias. Mini-review." *Neoplasma* 45(2): 53-59. Retrieved November 6, 2011.

10 Anhang

Anhang I: Untersuchungsbogen für die Laboruntersuchung

JUSTUS-LIEBIG-



FACHBEREICH 10



Veterinärmedizin

Befragung zur Doktorarbeit

Irina Gramer

Patienten-Nr.: _____

Fragebogen zum Thema: Zytostatikaverträglichkeit in der Tumor-Therapie

(vom Tierarzt auszufüllen)

Besitzer:

Name des Tieres:

Datum:

1. Laborparameter

Hämoglobin: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Neutropenie: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Thrombozytopenie: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

2. Gastrointestinal

Diarrhoe: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Vomitus: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

3. Sonstiges

_____: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

_____: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

_____: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

_____: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

II: Fragebogen Erstuntersuchung



FACHBEREICH 10



Veterinärmedizin

Befragung zur Doktorarbeit

Irina Gramer

Patienten-Nr.: _____

Fragebogen zum Thema: Zytostatikaverträglichkeit in der Lymphom-Therapie*Bitte füllen Sie hier alles Fettgedruckte aus!***Besitzer:****Telefon:****Datum:****Rufname des Hundes:****Geschlecht:****Alter:****Rasse:**kastriert: ☐ ja ☐ nein

1. Sind bei Ihrem Tier andere Erkrankungen bekannt, die medikamentös behandelt werden?
Wenn ja, welche und mit welchen Medikamenten werden diese behandelt?

2. Sind Tumorerkrankungen bei verwandten Tieren aufgetreten?

☐ Wurfgeschwister ☐ Elterntiere ☐ Großelterntiere ☐ nicht bekannt

3. Sind Tumore bei Ihrem Tier schon einmal zu einem früheren Zeitpunkt aufgetreten?

☐ nein ☐ ja, welche: _____

4. Ist Ihr Hund bereits mit Glukokortikoiden antherapiert worden? Wenn ja, über welchen Zeitraum und in welcher Dosierung?

5. Kreuzen Sie im Folgenden bitte diejenige Ziffer an, die den aktuellen Gesundheitszustand Ihres Tieres am besten beschreibt.

1 trifft überhaupt nicht zu	2 trifft teilweise zu	3 normal	4 trifft gering- gradig zu	5 trifft zu
Lebensfreude				
Mein Tier will spielen				1 2 3 4 5
Mein Tier reagiert auf meine Anwesenheit				1 2 3 4 5
Mein Tier freut sich des Lebens				1 2 3 4 5
Aufmerksamkeitslevel				
Mein Tier hat mehr gute als schlechte Tage				1 2 3 4 5
Mein Tier schläft mehr und ist weniger wach				1 2 3 4 5
Mein Tier ist abwesend, nicht aufmerksam				1 2 3 4 5
Schmerzen				
Mein Tier hat Schmerzen				1 2 3 4 5
Mein Tier hechelt, auch in Ruhe				1 2 3 4 5
Mein Tier zittert gelegentlich				1 2 3 4 5
Appetit/Verdauung				
Mein Tier frisst normal				1 2 3 4 5
Meinem Tier ist es übel oder es erbricht				1 2 3 4 5
Mein Tier frisst Leckerlis				1 2 3 4 5
Hygiene				
Mein Tier hält sich selbst sauber				1 2 3 4 5
Mein Tier riecht nach Urin oder zeigt Hautirritationen				1 2 3 4 5
Das Fell meines Tieres ist fettig, struppig oder stumpf				1 2 3 4 5
Wasseraufnahme				
Mein Tier trinkt adäquat				1 2 3 4 5
Mein Tier hat Durchfall				1 2 3 4 5
Mein Tier setzt normale Mengen Urin ab				1 2 3 4 5
Mobilität				
Mein Tier bewegt sich normal				1 2 3 4 5
Mein Tier liegt den ganzen Tag auf einem Platz				1 2 3 4 5
Mein Tier ist genauso aktiv wie vor der Erkrankung				1 2 3 4 5

Anhang III: Fragebogen Folgeuntersuchung

JUSTUS-LIEBIG-

UNIVERSITÄT
GIESSEN

FACHBEREICH 10



Veterinärmedizin

Befragung zur Doktorarbeit

Irina Gramer

Patienten-Nr.: _____

Fragebogen zum Thema: Zytostatikaverträglichkeit in der Lymphom-Therapie*Bitte füllen Sie hier alles Fettgedruckte aus!***Besitzer:****Hunde-Name:****Datum:**

1. Wurden Ihrem Tier vom Haustierarzt zusätzlich Arzneimittel zu denen von uns verabreichten Medikamenten gegeben?

☐ nein ☐ ja, welche: _____

2. Kreuzen Sie im Folgenden bitte diejenige Ziffer an, die den aktuellen Gesundheitszustand Ihres Tieres am besten beschreibt.

1 trifft überhaupt nicht zu	2 trifft teilweise zu	3 normal	4 trifft gering- gradig zu	5 trifft zu
Lebensfreude				
Mein Tier will spielen und bewegt sich normal				1 2 3 4 5
Mein Tier hat mehr gute als schlechte Tage				1 2 3 4 5
Mein Tier schläft viel und ist weniger wach				1 2 3 4 5
Appetit				
Mein Tier frisst mehr als normal				1 2 3 4 5
Mein Tier frisst weniger als normal				1 2 3 4 5
Mein Tier frisst Leckerlis				1 2 3 4 5
Mein Tier hat Durchfall				1 2 3 4 5
Meinem Tier ist es übel oder es erbricht				1 2 3 4 5

3. Falls bei Ihrem Tier Erbrechen und Durchfall aufgetreten sein sollten, bitte charakterisieren Sie diese beiden Symptome hier genauer.

Erbrechen

☐ < 3-mal in 24 Stunden

☐ 3-5-mal in 24 Stunden oder > 2 Tage

Durchfall

☐ > 2 Stuhlgänge/d im Vergleich zu normal (i.V.z.n.) ☐ > 2-6 Stuhlgänge/d i.V.z.n.

☐ > 6 Stuhlgänge/d i.V.z.n.

11 Danksagungen

Zum Abschluss möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich stets bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Joachim Geyer und Dr. Martin Kessler, die mir dieses interdisziplinäre Dissertations-Thema zur Verfügung gestellt und ermöglicht haben. Vielen Dank Prof. Dr. Geyer für die umfassende gute Betreuung, für Diskussionen und Vorschläge während meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, dieses Thema aus der klinischen Onkologie, ein für mich sehr wichtiges und interessantes Fachgebiet, unter pharmakologischen Gesichtspunkten zu bearbeiten. Vielen Dank Dr. Martin Kessler für die Chance, Patienten für meine Doktorarbeit in der Tierklinik Hofheim begleiten zu dürfen, und für das entgegengebrachte Vertrauen, Patienten, die nicht Teil der Arbeit waren, mit zu betreuen.

Ich danke auch Prof. Dr. Ernst Petzinger, der mich an seinem Institut aufgenommen und diese Arbeit stets unterstützt hat.

Ein großer Dank geht auch an Regina Leidolf, Barbara Döring und Jasmin Kranz, die mich in für die Arbeit wichtige Methoden wie Real Time PCR, Hot Start PCR und RNA Isolation einge- arbeitet und mit dem Programm DNASTAR vertraut gemacht haben.

Ich danke auch all meinen anderen Kollegen am Institut für die gute Zusammenarbeit und die Gespräche im Sozialraum und Doktorandenzimmer. Weiterhin danke ich Christoph Zimmermann für die kompetente technische Unterstützung und Dorothee von Schnakenburg für ihre Unterstützung in administrativen Angelegenheiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anke Schwietzer, Dr. Bettina Kandel-Tschiederer und Dr. Jarno Schmidt, die mich stets mit Proben für meine Arbeit in der Tierklinik Hofheim versorgt haben und immer ein offenes Ohr bei onkologischen Fragen für mich hatten. Vielen Dank für die schöne und angenehme Zusammenarbeit und für die Gespräche im Büroraum. Dank euch, werde ich immer gerne nach Hofheim kommen und hoffe sehr, dass wir uns nicht aus den Augen verlieren werden.

Ich möchte auch all meinen anderen Kollegen in der Tierklinik Hofheim, vor allem aber Maria Schneider, Julia Großmann und Elena Godduhn, danken. Vielen Dank für die vielen Gespräche und die wunderbare Zusammenarbeit.

Ich danke Dr. Birgit Spindler, Beatrix Morlock und Sabrina Collica, dass sie mir Blutproben ihrer Hunde zur Verfügung stellten, für Falldiskussionen und die Möglichkeit, die Fallberichte ihrer Hunde für meine Arbeit verwenden zu dürfen.

Ich danke all meinen Freunden, Clarissa, Richard, Melanie, Kathrina, Sabrina und Maria für die vielen schönen Momente und Stunden, die wir miteinander verbracht haben. Vielen Dank, dass ihr mir immer zugehört und Mut gemacht habt!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern Norbert und Christa. Ich danke euch, dass ihr mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt und an mich geglaubt habt. Ohne euch wäre ich bestimmt nicht die Person, die ich heute bin. Ihr habt mich gelehrt auch in schwierigen Situationen nicht aufzugeben und mit Optimismus in die Zukunft zu blicken.

Auch möchte ich mich bei meiner Schwester, Eliana, für die Gespräche, ihre Zuversicht und Hilfe in allen Lebenssituationen bedanken.

Sowohl meinen Eltern als auch meiner Schwester möchte ich für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit danken!

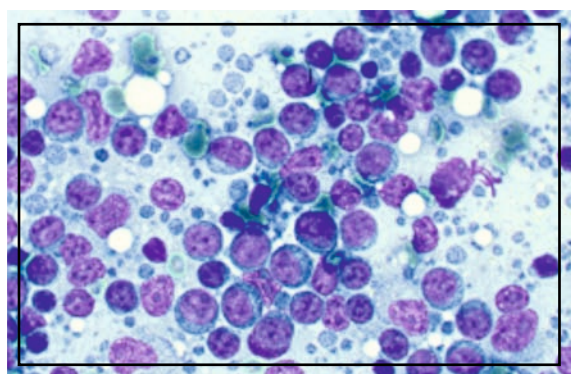
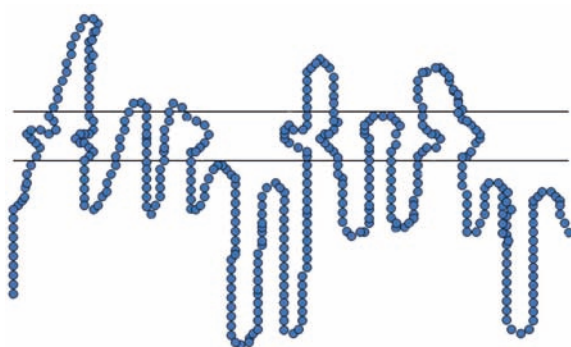
12 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation

„Polymorphismen in den MDR1-, MRP1- und cKIT-Genen des Hundes und ihre Bedeutung für eine individualisierte und zielgerichtete Krebstherapie!“

selbstständig und nur mit den in der Arbeit beschriebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Publikationen oder nicht veröffentlichten Schriften stammen, alle Angaben, die auf mündlichen Aussagen oder E-Mail-Korrespondenz beruhen, und alle Abbildungen, die von anderen Kollegen stammen, sind als solche gekennzeichnet. Außerdem habe ich bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen stets die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, niedergelegt in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“, eingehalten.

Irina Gramer



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6052-7



9 783835 196052 7

Cover photo: © TierfotografieWinter - Fotolia.com